

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO
DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE INGENIERÍA**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Ingeniería

Mención Tecnología Química

**“Obtención de Aceite de Canola
Aplicando Tecnologías
Emergentes”**

Núcleo Tecnología de Semillas (TECSE) – Dpto. de Ingeniería Química y
Tecnología de los Alimentos

Ramiro Julián Sánchez

Director: MSc. Ing. Susana M. Nolasco

Co-Director: Dra. Ing. María B. Fernández

Olavarria, Buenos Aires, Argentina – Marzo 2019

*“Un científico en su laboratorio no es un mero técnico:
también es un niño enfrentando fenómenos naturales
que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas.”*

Marie Skłodowska-Curie

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de Tesis MSc. Ing. Susana Nolasco y Dra. Ing. María Belén Fernández por brindarme su cariño, dedicación constante, paciencia y experiencia, y especialmente por animarse y confiar en mí para este trabajo aún sin conocerme.

Al Núcleo de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Semillas y Alimentos (TECSE) (Facultad de Ingeniería – UNCPBA) por brindarme la posibilidad de desarrollar este trabajo.

A las siguientes instituciones y entidades que mediante diversos tipos de financiamiento posibilitaron la realización del presente trabajo de tesis. A la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (APCyT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA).

A AL HIGH TECH S.R.L. (Argentina) por donar la canola utilizada durante este trabajo de tesis.

A la Dra. Natalia Izquierdo por realizar las mediciones de ácidos grasos de la presente tesis.

Al Dr. Gastón Barreto por su ayuda en la síntesis del canolol y análisis de GC/MS.

A los Dr. Sergio Tindiglia y Dr. Pablo Duché por los análisis de RMN.

A la Dra. Carmen Mateo por su paciencia y dedicación para enseñarme aspectos de las técnicas cromatográficas, también por tomarse el tiempo de poner a punto las técnicas utilizadas en la presente tesis.

A la Ing. Isabel Riccobene por darme una mano siempre, con apoyo y disposición para trabajar en el Departamento y así sentirme en casa desde el primer día.

A quienes fueron parte fundamental de mi formación Dra. Marianela Capitani, Ing. Karina de Figueiredo, Lic. Carlos Sologubitz y Lic. Micaela Magariño por todas sus enseñanzas. También por acogerme desde el primer día como uno de ustedes y brindarme su amistad y cariño.

A todos los integrantes del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos a los que en algún momento de estos 5 años moleste y quienes en todo momento me dieron su apoyo y contención.

RESUMEN

Actualmente existe una revalorización de la calidad de los productos primarios, la cual no solamente puede incidir fuertemente en el precio final del producto comercializado, sino también en su aceptación por el mercado y/o en los procesos tecnológicos.

En este sentido, la colza/canola (*Brassica napus L.*) es interesante dado su ciclo invierno-primavera, que le permite acceder al mercado en distintas épocas del año, incrementando el abastecimiento de la industria y no superponiéndose con las demás especies oleaginosas. El aceite posee una muy baja proporción de ácidos grasos saturados (7%), menor a la observada en el aceite de girasol; posee una adecuada relación de ácidos ω -6/ ω -3 y un interesante contenido de tocoferoles, siendo requerido por los mercados más exigentes.

Por otra parte, en la actualidad existe un sustancial interés por el uso de nuevas tecnologías de pretratamiento y/o extracción, como son el empleo de ultrasonido y microondas, tendientes a incrementar rendimientos, mantener o mejorar calidad de productos, acortar tiempos de extracción, disminuir el consumo de solventes orgánicos, reduciendo a su vez la contaminación. Asimismo, la producción más limpia es un desafío creciente y de compromiso con un desarrollo sustentable.

En virtud de las consideraciones realizadas se propuso realizar el estudio de los efectos que ejercen distintos procesos de la cadena agroindustrial sobre la calidad y/o la cinética de extracción del aceite de colza/canola, explorando nuevas tecnologías, como son el empleo de ultrasonido y

microondas, así como el uso de etanol como solvente (alternativa al n-hexano).

En el **Capítulo 1** se presenta una introducción a los aspectos y conceptos más generales que fueron aplicados a lo largo de esta tesis, incluyendo la importancia de la canola y su aceite tanto en la Argentina como en el mundo, así como un análisis de las distintas tecnologías emergentes utilizadas. A su vez se plantea el objetivo general y los objetivos específicos e hipótesis del presente estudio.

En el **Capítulo 2** se describe la caracterización de los granos de canola utilizados a lo largo de la tesis y, posteriormente, se evalúa la influencia de un pretratamiento con microondas aplicados a dichos granos sobre la calidad del aceite extraído, a partir de la determinación del valor de acidez, el índice de peróxidos, valor de p-anisidina y la composición de ácidos grasos. A su vez, se desarrolla una técnica para la determinación de canolol y tocoferoles por Ultra-Cromatografía Líquida de alta Presión (UHPLC), sintetizando canolol para su utilización como estándar externo.

En el **Capítulo 3** se analiza el efecto del pretratamiento con microondas sobre la cinética de la extracción con solvente (n-hexano) de aceite de canola, y se utilizan modelos adecuados para predecir y/o explicar los diversos fenómenos que intervienen en este proceso. Se desarrolla un modelo de ajuste bidimensional en función del tiempo y temperatura a partir del modelo de difusión de Fick modificado, permitiendo obtener los parámetros característicos con elevados coeficientes de correlación. A su vez, se modela la cinética de extracción a partir de una herramienta de inteligencia artificial. Para ello se desarrolla una estructura de Red

Neuronal Artificial (RNA) para modelar y predecir la cinética de extracción con solvente (n-hexano) de aceite de canola a distintas temperaturas para 3 muestras de granos y 3 condiciones (sin pretratamiento, pretratamiento hidrotérmico, pretratamiento con microondas) a partir de datos experimentales y extraídos de bibliografía.

En el **Capítulo 4** se estudia la extracción con solvente de aceite de canola utilizando etanol, a partir de granos pretratados con microondas y sin pretratar. Se construyen curvas de extracción y se aplica el modelo bidimensional desarrollado en el Capítulo 3. Dado que el etanol permite la extracción de componentes insolubles en n-hexano, se incluye una etapa de fraccionamiento con n-hexano con el fin de separar los mismos del extracto total. Por otro lado, se desarrolla un proceso de separación de los insolubles en n-hexano del extracto total, posterior a la extracción, sin la utilización de n-hexano. El mismo consta de varias etapas que involucran evaporación parcial del solvente, enfriamiento, centrifugación, decantación de fases y evaporación total del solvente; obteniendo por un lado aceite de canola y por otro lado un subproducto rico en antioxidantes (como tocoferoles y canolol).

A partir de los resultados obtenidos en los capítulos previos, en el **Capítulo 5** se estudia la extracción asistida por ultrasonido de aceite de canola utilizando como solvente etanol, a partir de granos pretratados con microondas. Se analizan distintos parámetros del proceso como tiempo de extracción, temperatura, tipo de solvente y relación sólido:solvente. Mediante la metodología superficie de respuesta se modela y posteriormente se optimiza el proceso para las respuestas

rendimientos de extracto total y fracción lipídica y contenido de tocoferoles totales. Al mismo tiempo, se evalúa el efecto del empleo de ultrasonido sobre la calidad y componentes menores (de la fracción lipídica tocoferoles y canolol).

Finalmente, se exponen las **Conclusiones generales** obtenidas a partir de este trabajo de Tesis y en base a ellas las **Perspectivas futuras**.

ABSTRACT

Nowadays there is a revaluation of the quality of primary products, which can not only strongly affect the final price of the marketed product but also its acceptance by the market and/or in the technological processes. In this regard, canola (*Brassica napus* L.) is interesting due to its winter-spring cycle, which allows it to enter the market at different time of the year, increasing the supply of the industry and not overlapping with other oilseeds. Its oil has a very low proportion of saturated fatty acids (7%), lower than that observed in sunflower oil, containing an adequate ratio of ω -6 and ω -3 acids and an interesting content of tocopherols, being required by the most demanding markets.

On the other hand, there is currently a growing interest in the use of new technologies of pretreatment and/or extraction, such as the use of ultrasound and microwaves, tending to increase yields, maintain or improve product quality, shorten extraction times and decrease the consumption of organic solvents, reducing pollution at the same time. Likewise, cleaner production is a growing challenge and commitment to sustainable development.

On the basis of the above considerations, it was proposed to study the effects that different processes of the agroindustrial chain have on the quality and/or kinetics of canola oil extraction, exploring new technological alternatives, such as the use of ultrasound and microwave, and the use of ethanol as a solvent (an alternative to hexane).

Chapter 1 presents an introduction of general aspects and concepts that were applied throughout this thesis, including the importance of canola and its oil in Argentina and worldwide and the analysis of the different emerging technologies used. Besides, the general objective the specific objectives and the hypotheses of this study are posed.

Chapter 2 describes the characterization of canola seeds used in this thesis, and, subsequently, the influence of a microwave pretreatment applied the seeds on the quality of the extracted oil is evaluated from the determination of acidity value, peroxide index, p-anisidine value and fatty acid composition. Besides, a technique for the determination of canolol and tocopherols by ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) is developed, together with the synthesis of canolol for its use as external standard.

Chapter 3 analyses the effect of the microwave pretreatment on the kinetics extraction of canola oil with solvent (hexane), and adequate models for predicting and/or explaining several phenomenom that intervene in the process are used. A bidimensional fitting model (function of time and temperature) is developed from the modified Fick diffusion model, allowing to obtain characteristic parameters with high correlation coefficients. Besides, kinetics of oil extraction in modeled with an artificial intelligence tool. For this purpose and structure of Artificial Neural Network is used in order to model and predict the extraction kinetics of canola oil with hexane at different temperatures, utilizing three samples of seeds and three conditions (without pretreatment, hydrothermally treated and microwaved) using experimental and reported data.

Chapter 4 studies the solvent extraction of canola oil using ethanol from seeds microwaved and without pretreatment. Extraction curves are constructed and the bidimensional model developed in Chapter 3 is applied. Since ethanol allows the extraction of oil-insoluble components, a fractionation step with hexane is included in order to separate these compounds from the total extract. On the other hand, a process of separation of the insoluble compounds from the total extract after extraction without the use of hexane is developed. It consists of several stages that involve partial evaporation of the solvent, cooling, centrifugation and decanting of phases; obtaining on the one hand canola oil and on the other hand a byproduct rich in antioxidants (tocopherols and canolol).

From the results obtained in the previous chapters, **Chapter 5** studies the ultrasound-assisted extraction of canola oil using ethanol as solvent from microwaved seeds. Different process parameters such as extraction time, temperature, type of solvent, solid:solvent ratio were analyzed. Then the optimization was carried out by means of response surface methodology for different responses: extract yield, lipid fraction yield and tocopherols content. At the same time, the effect of the use of ultrasound on the quality and minor compounds content of the lipid fraction is evaluated.

Finally, the **General Conclusions** obtained from this Thesis are exposed and, based on them, the **Future Perspectives**.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y MARCO TEÓRICO	41
1.1. INTRODUCCIÓN	41
1.2. MARCO TEÓRICO	43
1.2.1. ¿Por qué aceite de canola?	43
1.2.1.1. Canola (Colza 00)	43
Composición del grano de colza/canola	45
Producción en Argentina	45
1.2.1.2. Aceite de colza/canola	48
Producción mundial	48
1.2.2. Definición del problema	50
1.2.2.1. Producción de aceite de colza/canola en Argentina	50
1.2.2.2. Obtención de aceite	51
Pretratamientos convencionales	52
Extracción por prensado	54
Extracción por solvente	55
1.2.3. Alternativas	58
1.2.3.1. Tecnologías emergentes	58
Microondas	60
Etanol	62
Ultrasonido	64
1.3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	66
1.3.1. Objetivo general	66
1.3.2. Objetivos específicos	67

1.3.3. Hipótesis.....	65
-----------------------	----

CAPÍTULO 2

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS SOBRE LA CALIDAD Y COMPONENTES MENORES DEL ACEITE 69

2.1. INTRODUCCIÓN..... 69

Pretratamiento con microondas69

Objetivos73

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 73

2.2.1. Caracterización de los granos de canola74

2.2.1.1. Determinación de humedad74

2.2.1.2. Determinación del contenido de aceite74

2.2.1.3. Determinación del contenido de proteínas75

2.2.1.4. Determinación del contenido de fibra cruda76

2.2.1.5. Determinación del contenido de cenizas77

2.2.1.6. Determinación del contenido de carbohidratos78

2.2.2. Pretratamiento y obtención de aceites78

2.2.2.1. Calibración del microondas78

2.2.2.2. Pretratamiento de las muestras con microondas79

2.2.2.3. Obtención de aceite.....79

2.2.3. Caracterización de los aceites80

2.2.3.1. Determinación de tocoferoles y canolol (3,5-dimethoxy-4-hidroxibenzaldehído80

Síntesis del patrón estándar de canolol a partir de siringaldehído80

Análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)...83

Análisis por cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (GS/MS)
.....84

Análisis por cromatografía líquida de alta presión (UHPLC)	86
Determinación de tocoferoles y canolol por UHPLC	87
2.2.3.2. Composición de ácidos grasos	90
2.2.3.3. Determinación del valor de acidez (VA)	90
2.2.3.4. Determinación del índice de peróxidos (IP)	91
2.2.3.5. Determinación del valor de p-anisidina (pAV)	93
2.2.3.6. Cálculo del valor de Totox	94
2.2.3.7. Análisis estadístico	94
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
2.3.1. Composición proximal de los granos de canola.....	94
2.3.2. Humedad final de la muestra pretratada con microondas.....	96
2.3.3. Análisis de los aceites obtenidos	96
2.3.3.1. Contenido de tocoferoles y canolol.....	97
2.3.3.2. Composición de ácidos grasos	98
2.3.3.3. Valor de acidez e índice de peróxido (IP)	100
2.4. CONCLUSIONES PARCIALES	101

CAPÍTULO 3

MODELADO DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN CON HEXANO DE ACEITE DE CANOLA	103
3.1. INTRODUCCIÓN	103
Modelo de difusión de Fick modificado	104
Redes neuronales artificiales	107
Perceptrón “feedforward” multicapa	108
Objetivos	108
3.2. PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS: MODELADO DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE ACEITE.....	110

3.2.1. Materiales y métodos.....	110
3.2.1.1. Tratamiento antes de la extracción.....	110
3.2.1.2. Determinación del tamaño de partícula	110
3.2.1.3. Ensayos cinéticos.....	111
3.2.1.4. Modelo de difusión de Fick modificado.....	112
3.2.1.5. Análisis estadístico.....	113
3.2.2. Resultados y discusión.....	115
3.2.2.1. Tamaño de partícula	115
3.2.2.2. Cinética de extracción de aceite.....	116
3.2.2.3. Modelo de difusión de Fick modificado.....	118
Modelo simplificado	118
Modelo incluyendo más de un término de la serie.....	122
Modelo seleccionado (9 términos).....	124
Coefficientes de difusión efectiva	128
Dependencia con la temperatura	129
3.2.2.4. Modelo de difusión de Fick modificado bidimensional (dependiente de la temperatura y el tiempo)	131
3.3. MODELADO CON REDES NEURONALES ARTIFICIALES (RNA)	134
3.3.1. Metodología	134
3.3.1.1. Datos experimentales	134
3.3.1.2. Red neuronal artificial (RNA).....	134
3.3.1.3. Pre-procesamiento de los datos	137
3.3.2. Resultados y discusión.....	138
3.3.2.1. RNA óptima	138
3.3.2.2. Datos simulados por modelos MD y RNA.....	145
3.4. CONCLUSIONES PARCIALES	147
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	149

CAPÍTULO 4

EXTRACCIÓN DE ACEITE DE CANOLA UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE 151

4.1. INTRODUCCIÓN 151

Solventes verdes 151

Etanol: antecedentes en extracción de aceite 152

Extracción de compuestos minoritarios 153

Objetivos 154

4.2. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN 155

4.2.1. Materiales y métodos 155

4.2.1.1. Tratamiento antes de la extracción 155

4.2.1.2. Extracción de aceite 155

4.2.1.3. Dependencia de la extracción con la temperatura 157

4.2.1.4. Modelo matemático 157

4.2.1.5. Micrografía electrónica de barrido (SEM) 1563

4.2.1.6. Análisis estadístico 157

4.2.2. Resultados y discusión 158

4.2.2.1. Rendimientos de extracción a diferentes temperaturas 158

4.2.2.2. Modelos de las respuestas E y FL para granos de canola sin pretratamiento con microondas 163

4.2.2.3. Pretratamiento con microondas 166

4.2.2.4. Micrografías electrónicas de barrido de granos molidos pre y pos extracción 169

4.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR SEPARACIÓN DE FASES (LIBRE DE N-HEXANO) 172

4.3.1. Materiales y métodos 172

4.3.1.1. Pretratamiento con microondas 172

4.3.1.2. Extracciones	172
4.3.1.3. Obtención de aceite.....	173
4.3.1.4. Determinación del contenido de carbohidratos Totales	176
4.3.1.5. Análisis estadístico	178
4.3.2. Resultados y discusión	178
4.4. ANÁLISIS DE CALIDAD DE LAS FRACCIONES FL y SH-EtF	181
4.4.1. Materiales y métodos	181
4.4.1.1. Índices de calidad	181
4.4.1.2. Determinación del contenido de tocoferoles y canolol	181
4.4.2. Resultados y discusión	182
4.4.2.1. Composición de ácidos grasos	182
4.4.2.2. Contenido de tocoferoles y canolol.....	182
4.4.2.3. Valores de acidez, peróxidos, p-anisidina y Totox	185
4.5. CONCLUSIONES PARCIALES	188
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	191

CAPÍTULO 5

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU) DE ACEITE DE CANOLA	193
5.1. INTRODUCCIÓN.....	193
Objetivos.....	195
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	196
5.2.1. Preparación de la materia prima	196
5.2.2. Equipo utilizado en la extracción asistida por ultrasonido	196
5.2.3. Estudio exploratorio de variables	198
5.2.4. Proceso de extracción asistido por ultrasonido.	199
5.2.4.1. Estudio de las variables del proceso	199

5.2.4.2. Optimización del proceso	201
5.2.4.3. Propiedades de la fracción lipídica (FL)	201
5.2.5. Extracción con distintos solventes.....	201
5.2.6. Análisis estadístico.....	202
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	202
5.3.1. Estudio exploratorio de variables	202
5.3.2. Proceso de extracción asistido por ultrasonido, modelos de regresión y análisis de resultados mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR).....	205
5.3.2.1. Diseño experimental y valores experimentales.....	205
5.3.2.2. Análisis de las variables.....	208
5.3.2.3. Respuestas rendimiento de E y FL (Y_1 e Y_2)	210
5.3.2.4. Respuesta CTT (Y_3).....	214
5.3.2.5. Validación de los modelos	216
5.3.2.6. Optimización	217
5.3.2.7. Parámetros de calidad del aceite obtenido en las condiciones óptimas	220
5.3.3. Extractos obtenidos con distintos solventes	222
5.4. CONCLUSIONES PARCIALES	226
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	228
 CONCLUSIONES GENERALES	 229
Pretratamiento con microondas y extracción de ceite con n-hexano.....	230
Extracción sólido-líquido con etanol	233
Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	235
 PERSPECTIVAS FUTURAS	 238

BIBLIOGRAFÍA.....	240
--------------------------	------------

ANEXOS.....	- 260 -
--------------------	----------------

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Tabla 2-1. Contenido de tocoferoles en distintos aceites vegetales.....	70
Tabla 2-2. Métodos de determinación de tocoferoles y canolol por HPLC.....	71
Tabla 2-3. Desplazamientos químicos RMN del compuesto sintetizado (canolol).....	84
Tabla 2-4. Condiciones de trabajo empleadas (GS/MS) en la determinación del compuesto sintetizado (canolol).	85
Tabla 2-5. Condiciones de trabajo empleadas (UHPLC) en la determinación canolol.....	86
Tabla 2-6. Recta de calibración de los tocoferoles.	87
Tabla 2-7. Recta de calibración del canolol.	89
Tabla 2-8. Condiciones de trabajo empleadas en la determinación de ácidos grasos por cromatografía gas-líquida.....	90
Tabla 2-9. Composición proximal de los granos de canola en base seca.....	95
Tabla 2-10. Contenido de tocoferoles y canolol de los aceites de canola obtenidos de granos con y sin pretratamiento con microondas.	97
Tabla 2-11. Composición de ácidos grasos de los aceites de canola obtenidos de granos con y sin pretratamiento con microondas.....	99

Tabla 2-12. Valor de acidez (VA), índice de peróxidos (IP), valor de p-anisidina (pAV) y valor Totox (Totox) de los aceites de canola obtenidos de granos con y sin pretratamiento con microondas.....	100
---	-----

CAPÍTULO 3

Tabla 3-1. Distintos modelos matemáticos utilizados para describir la cinética de extracción de aceites vegetales.....	104
---	-----

Tabla 3-2. Diámetros y radios medios de las muestras de canola molida pretratada con microondas y sin pretratar.	116
--	-----

Tabla 3-3. Parámetros para el modelo simplificado del modelo de difusión de Fick modificado.....	119
---	-----

Tabla 3-4 Coeficientes de los modelos ajustados para muestras sin pretratar y pretratadas con microondas (Microondas).	126
--	-----

Tabla 3-5. Coeficientes de difusión efectiva para las muestras pretratadas y sin pretratar a distintas temperaturas.....	128
---	-----

Tabla 3-6. Coeficientes del modelo de difusión de Fick modificado bidimensional (función de tiempo y temperatura) ajustados para muestras sin pretratar y pretratadas con microondas (Microondas)..	132
---	-----

Tabla 3-7. Características de las muestras de canola.	134
---	-----

Tabla 3-8. Datos de entrada a la RNA.....	135
--	-----

Tabla 3-9. Parámetros de la RNA óptima	141
---	-----

Tabla 3-10. Comparacion de RMSE y R^2 entre los MD y el modelo de RNA para distintas variables operativas.	144
--	-----

Tabla 3-11. Comparación entre respuestas simuladas por los modelos difusivos (MD) y el modelo de RNA para distintas variables operativas.	146
---	-----

CAPÍTULO 4

Tabla 4-1. Coeficientes del modelo de difusión de Fick modificado a temperatura constante ajustado para la respuesta E (Extracto total libre de solvente). Granos de canola sin pretratamiento con microondas. Solvente: etanol..	163
---	-----

Tabla 4-2. Coeficientes del modelo de difusión de Fick modificado bidimensional ajustados para la respuesta FL (Fracción Lipídica)..	164
--	-----

Tabla 4-3. Coeficientes de difusión efectiva (D_{eff}) para la fracción lipídica (FL).....	166
--	-----

Tabla 4-4. Rendimientos de extracción de aceite y/o FL (%bs) de granos de canola procesados de formas diferentes (muestras), empleando dos relaciones sólido:líquido a 333K.....	168
---	-----

Tabla 4-5. Rectas de calibración de glucosa.....	177
---	-----

Tabla 4-6. Rendimiento de las fracciones obtenidas por los procesos P1 y P2 (extracción con etanol), para granos de canola pretratados con microondas (Microondas) y sin pretratar, y de aceite obtenido con n-hexano (granos sin pretratamiento con microondas).....	179
--	-----

Tabla 4-7. Composición de ácidos grasos de las fracciones solubles en n-hexano (FL) obtenidas por los procesos P1 y P2 (muestras de granos de canola pretratadas con microondas y sin pretratar) y por extracción con n-hexano.....	182
--	-----

Tabla 4-8 Contenido de tocoferoles y canolol de las fracciones de extracto soluble en n-hexano (FL y SH-EtF) obtenidas por los procesos P1 y P2 (pretratadas con microondas y sin pretratar) y aceite extraído con n-hexano.....	184
---	-----

Tabla 4-9. Índices de calidad de las fracciones de extracto solubles en n-hexano (FL) obtenidas por los procesos P1 y P2, y aceite obtenido con n-hexano.....	186
--	-----

CAPÍTULO 5

Tabla 5-1. Diseño experimental: variables independientes y los correspondientes niveles utilizados para la optimización de la extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola pretratados con microondas.	206
--	-----

Tabla 5-2. Diseño experimental Dohelert en variables codificadas utilizado para la optimización de la extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola pretratados con microondas y resultados experimentales para las respuestas seleccionadas.....	207
---	-----

Tabla 5-3 Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste de los modelos completos para los rendimientos de extracto total (E), fracción lipídica (FL) y contenido de tocoferoles totales (CTT).....	208
--	-----

Tabla 5-4 Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste de los modelos simplificados para los rendimientos de extracto total (E), fracción lipídica (FL) y contenido de tocoferoles totales (CTT).	209
---	-----

Tabla 5-5. Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste del modelo completo para la respuesta contenido de tocoferoles totales (CTT) expresado en $\mu\text{g/g}$ grano.	215
--	-----

Tabla 5-6. Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste del modelo simplificado para la respuesta contenido de tocoferoles totales (CTT) expresado en $\mu\text{g/g}$ grano.	216
Tabla 5-7. Valores de las variables independientes (E, FL y CTT) predichos y obtenidos experimentalmente en las condiciones operativas seleccionadas para validar los modelos generados	218
Tabla 5-8. Condiciones óptimas para el proceso de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola pretratado con microondas	218
Tabla 5-9. Valor de acidez (VA), índice de peróxidos (IP), valor de p-anisidina (pVA) y valor de Totox (Totox) para el aceite obtenido en las condiciones óptimas correspondiente al rendimiento de la fracción lipídica (FL) (Extracción con etanol asistida por ultrasonido, temperatura 311 K, tiempo de extracción 3600 s y 57% de amplitud granos pretratados con microondas).	221
Tabla 5-10. Rendimientos de extracto total (E) y fracción del extracto soluble en n-hexano (FL) obtenidos por extracción asistida por ultrasonido para distintos solventes a partir de granos con o sin pretratamiento con microondas; algunas características de los FL obtenidos.....	223
Tabla 5-11. Contenido de tocoferoles y canolol en las fracciones de extracto soluble en n-hexano (FL) obtenidas a partir de granos con y sin pretratamiento con microondas y diferentes solventes, expresados como $\mu\text{g/g}$ grano en base seca.	225

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1-1. Granos de canola (<i>Brassica napus L.</i>) variedad invernal.....	44
Figura 1-2. Producción de granos de colza en la Provincia de Buenos Aires y Argentina (Ministerio de Producción y Trabajo, 2019).	46
Figura 1-3. Producción mundial de los principales aceites vegetales (FAO/OMS, 2019).....	49
Figura 1-4. Producción real (FAO/OMS, 2019) y potencial calculada de aceite de colza en Argentina en el período 1997-2014	50
Figura 1-5. Diagrama de flujo de un proceso convencional de extracción de aceite de canola.....	52
Figura 1-6. Movimiento de las moléculas en un campo de microondas.	61
Figura 1-7. Producción de bioetanol en Argentina (Ministerio de Hacienda ^a , 2018). * Datos provisorios Septiembre de 2018.....	63
Figura 1-8. Formación de las microburbujas y colapso.....	65

CAPÍTULO 2

Figura 2-1. Reacción de síntesis del canolol.	81
Figura 2-2. Compuesto 3,5-dimethoxy-4-hidroxibenzaldehído sintetizado y purificado.....	82
Figura 2-3. Estructura molecular del canolol.	83

Figura 2-4. Cromatograma (GC) del compuesto sintetizado (canolol).....	85
Figura 2-5. Espectro de masa del compuesto sintetizado (canolol)..	86
Figura 2-6. Cromatograma UHPLC del compuesto sintetizado (canolol).....	87
Figura 2-7. Cromatograma UHPLC del aceite de canola correspondiente a la muestra pretratada con microondas.	97
Figura 2-8. Cromatograma de ácidos grasos del aceite de canola....	99

CAPÍTULO 3

Figura 3-1. Distribución de partículas de las muestras molidas. ST: muestras sin pretratar. MO: muestras pretratadas con microondas.	115
Figura 3-2. Rendimientos de extracción de aceite de canola a distintas temperaturas para la muestra sin pretratar	117
Figura 3-3. Rendimientos de extracción de aceite de canola a distintas temperaturas para la muestra pretratada con microondas.	117
Figura 3-4. Gráfico de la serie exponencial en función de distintos valores de B. Líneas de puntos indican el tiempo a partir del cual la simplificación es válida para cada caso. t_{\min} y t'_{\min} : tiempo a partir del cual es válida la simplificación.	120
Figura 3-5. Rendimiento relativo de aceite a 298 K para la muestra sin pretratar y ajustes con modelos de 1 y 6 términos tomando $M_0/M_{\infty}=-0,03$; $B = 6,3 \cdot 10^{-5}$	121
Figura 3-6. Esquema de cálculo para la cantidad de términos necesarios de la serie. k: cantidad de términos ingresados en el ajuste de los datos. M_0/M_{∞} : cantidad de aceite relativa al obtenido a tiempo infinito durante	

la etapa de lavado. B: parámetro del modelo obtenido del ajuste. t_{\min} : menor tiempo de extracción experimental. i: contador. n: cantidad de términos necesarios para realizar el ajuste. 123

Figura 3-7. Rendimiento relativo de aceite a distintas temperaturas para muestras de canola sin pretratar y curva ajustada según modelo difusión de Fick modificado con M_0/M_∞ constante con la temperatura. 127

Figura 3-8. Rendimiento relativo de aceite a distintas temperaturas para muestras de canola pretratada con microondas y curva ajustada según modelo difusión de Fick modificado con M_0/M_∞ constante con la temperatura. 127

Figura 3-9. Linealización de la ecuación de Arrhenius. (●) Pretratadas con microondas. (○) Sin pretratar. LN Deff: logaritmo natural del coeficiente de difusión efectiva. T: temperatura (K)..... 130

Figura 3-10. Rendimientos relativos para muestras pretratadas con microondas (amarillo) y sin pretratar (rojo) a distintas temperaturas y superficies de ajuste según Ecuación 3.28 ($R^2_{\text{ajus}} = 0,992$; $p < 0,0001$ y $R^2_{\text{ajus}} = 0,990$; $p < 0,0001$; respectivamente). 133

Figura 3-11. Diagrama esquemático del modelo óptimo de RNA feedforward multicapa encontrado. x_i : i-ésima entrada; w_{Hij} : peso correspondiente a la i-ésima entrada de j-ésima neurona de la capa oculta; b_{Hj} : umbral de la j-ésima neurona de la capa oculta; w_{ojk} : peso correspondiente a la j-ésima entrada de la k-ésima neurona de la capa de salida; b_{ok} : umbral de la k-ésima neurona de la capa de salida; tansig: función tangente sigmoidea; purelin: función identidad; y_j : salida de la neurona j de la capa oculta; z_1 : salida de la RNA. 139

Figura 3-12. Criterio de detención y tendencias del error cuadrado medio (mse) de los grupos de entrenamiento, validación y predicción en función de las épocas (Épocas). 140

Figura 3-13. Valores experimentales y predichos por la RNA. ϕ : coeficiente lineal de la recta de correlación. ψ : término independiente de la recta de correlación. (A) Muestra C ₁ sin pretratar. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,984$ (B) Muestra C ₂ sin pretratar. $\phi = 0,99$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,973$ (C) Muestra C ₂ pretratada hidrotérmicamente. $\phi = 0,96$, $\psi = 0,05$, $R^2 = 0,923$. (D) Muestra C ₃ sin pretratar. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,993$ (E) Muestra C ₃ pretratada con microondas. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,993$ (F) Datos totales. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,988$	142
--	-----

CAPÍTULO 4

Figura 4-1. Proceso de obtención de fracción lipídica (FL) por lavado con n-hexano. Et: extracto total. E: extracto total libre de solvente. EIH: extracto insoluble en n-hexano.....	156
Figura 4-2. Rendimientos de E y FL a 313 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. E: extracto total libre de solvente..	159
Figura 4-3. Rendimientos de E y FL a 323 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. E: extracto total libre de solvente..	159
Figura 4-4. Rendimientos de E y FL a 333 K, y relación sólido:solvente 1:17 para granos de canola. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. E: extracto total libre de solvente..	160
Figura 4-5. Rendimientos de aceite a 313 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. Solvente etanol: fracción de extracto soluble en n-hexano extraído con etanol (FL). Solvente n-hexano: aceite extraído con n-hexano. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$)..	161

Figura 4-6. Rendimientos de aceite a 323 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. Solvente etanol: fracción de extracto soluble en n-hexano extraído con etanol (FL). Solvente n-hexano: aceite extraído con n-hexano. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$)..... 162

Figura 4-7. Rendimientos de aceite a 333 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. Solvente etanol: fracción de extracto soluble en n-hexano extraído con etanol (FL). Solvente n-hexano: aceite extraído con n-hexano. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$). 163

Figura 4-8. Rendimientos relativos de extracto soluble en n-hexano (FL) y superficie de ajuste ($R^2_{\text{ajus}} = 0,990$; $p \leq 0,0001$)..... 164

Figura 4-9. Rendimientos de extracción con etanol de extracto total libre de solvente (E) para muestras de granos de canola pretratadas con microondas y sin pretratar a 333 K y relación sólido:solvente 1:17. MO: muestra pretratada con microondas. ST: muestra sin pretratar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$)..... 167

Figura 4-10. Rendimientos de extracción con etanol de fracción lipídica (FL) para muestras de granos de canola pretratadas con microondas y sin pretratar a 333 K y relación sólido:solvente 1:17. MO: muestra pretratada con microondas. ST: muestra sin pretratar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$).. 167

Figura 4-11. Micrografías electrónicas de barrido de granos de canola molidos. (A) Granos molidos. B) Granos molidos y extraídos con n-hexano. (C) Granos molidos extraídos con etanol. (D) Granos pretratados con microondas y molidos. (E) Granos pretratados con microondas, molidos y extraídos con n-hexano. (F) Granos pretratados con microondas, molidos y extraídos con etanol..... 170

Figura 4-12. Esquema de los procesos aplicados para la obtención de aceite. P1: Proceso 1: lavado con n-hexano. P2: Proceso 2: separación de fases. Et: extracto total. E: extracto total libre de solvente. EIH: fracción de extracto insoluble en n-hexano para el P1. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano para el P1 y P2. FS: fase sólida obtenida por el P2. EtF: solubles en la fase rica en etanol..... 174

Figura 4-13. Fases generadas mediante la aplicación del proceso P2 para la obtención de aceite. FL+Etanol: Fase rica en aceite. FS: Fase sólida. EtF+Etanol: Fase rica en solvente..... 175

CAPÍTULO 5

Figura 5-1. Punta ultrasónica VCS-500 (Sonics & Materials, USA)... 197

Figura 5-2. Diseño Doehlert de tres variables 199

Figura 5-3. Rendimientos de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola a distintas relaciones sólido:solvente. E: extracto total. FL: fracción lipídica. Amplitud de ultrasonido: 50%, Solvente: etanol 99%, Tiempo de extracción: 1800 s, Temperatura: 333 K. Letras diferentes para el mismo color indican diferencias significativas (Tukey test, $p \leq 0,05$) 203

Figura 5-4. Rendimientos de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola a distintas amplitudes de ultrasonido. E: extracto total. FL: fracción lipídica. Solvente: etanol 99%, Relación sólido:solvente: 1:28, Tiempo de extracción: 1800 s, Temperatura: 333 K. Letras diferentes para el mismo color indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$) 204

Figura 5-5. Rendimientos de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola a distintos tiempos de extracción. E: extracto total. FL: fracción lipídica. Solvente: etanol 99%, Relación

sólido:solvente: 1:28, Amplitud: 50%, Temperatura: 333 K. Letras diferentes para el mismo color indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$) 205

Figura 5-6. Superficies de respuestas. (a) Rendimiento de extracto total (E,%bs) a 40% de amplitud constante. (b) Rendimiento de extracto total (E,%bs) para un tiempo de extracción de 2940 s (c) Rendimiento de extracto total (E,%bs) a temperatura constante de 323 K. 211

Figura 5-7. Superficies de respuestas. (a) Rendimiento de fracción lipídica (FL,%bs) a 40% de amplitud constante. (b) Rendimiento de fracción lipídica (FL,%bs) para un tiempo de extracción de 2940 s. (c) Rendimiento de fracción lipídica (FL,%bs) a temperatura constante de 323 K..... 212

Figura 5-8. Superficies de respuestas. (a) Contenido de tocoferoles totales (CTT, $\mu\text{g/g}$) a 40% de amplitud constante. (b) Contenido de tocoferoles totales (CTT, $\mu\text{g/g}$) para un tiempo de extracción de 2940 s. (c) Contenido de tocoferoles totales (CTT, $\mu\text{g/g}$) a temperatura constante de 323K..... 213

Listado de Abreviaturas

LEAR	Colza de bajo ácido erúico.
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles.
TAG	Triacilglicerol.
C22:1	Ácido erúico.
HEAR	Colza de alto contenido de ácido erúico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
UHPLC	Ultra cromatografía líquida de alta presión.
%bs	Porcentaje en base seca.
H	Contenido de humedad de los granos de canola (%bs).
%N	Contenido de nitrógeno de los granos de canola (%bs).
%FC	Contenido de fibra cruda de los granos de canola (%bs).
%Cenizas	Contenido de cenizas de los granos de canola (%bs).
ELN	Extracto libre de nitrógeno de los granos de canola (%bs).
PA	Potencia absorbida por el agua (W).
m_w	Masa de agua (kg).
C_{p_w}	Calor específico (J/°C kg).
ΔT	Diferencia de temperatura (°C, K).
$\Delta \theta$	Tiempo de exposición (s).
PMC	2,2,5,7,8 pentamethyl-6-chromanol.
α -Toc	Alfa tocoferol ($\mu\text{g/mL}$).
VA	valor de acidez (mg KOH/g).
IP	Índice de peróxidos (meq/kg).
pAV	Valor de p-anisidina.
Totox	Índice de productos totales de oxidación.
α -TC	Alfa tocoferol ($\mu\text{g/g}$).
β -TC	Beta tocoferol ($\mu\text{g/g}$).
γ -TC	Gamma tocoferol ($\mu\text{g/g}$).
δ -TC	Delta tocoferol ($\mu\text{g/g}$).
CTT	Contenido de tocoferoles totales ($\mu\text{g/g}$).
C16:0	Ácido palmítico.

C18:0	Ácido esteárico.
C18:1	Ácido oléico.
C18:2	Ácido linoléico.
C18:3	Ácido linolénico.
t	Tiempo (s).
M	Masa de aceite que difunde (g aceite).
B	Coeficiente/Parámetro del modelo de ajuste (1/s).
D_{eff}	Coeficiente de difusión efectiva (m^2/s).
R_m	Radio medio de partícula (m).
A	Parámetro del modelo de ajuste (adimensional).
RNA	Redes neuronales artificiales.
y	Salida de una neurona de la capa oculta.
v_i	Componente del vector de entrada.
n	Número de entradas a la neurona.
f	Función de activación.
w	Peso asociado a una entrada.
b	Umbral asociado a una neurona.
D_p	Diámetro de partícula (m).
Rend	Rendimiento de aceite (%bs).
M_0/M_∞	Cantidad de aceite relativo al obtenido a tiempo infinito durante la etapa de lavado (fracción de lavado)/Parámetro del modelo de ajuste (adimensional).
ESC	Extra suma de cuadrados.
F	Estadístico de la distribución de Snedecor.
F_0	Estadístico de contraste para la comparación de parámetros.
F_c	Valor crítico de la distribución F de Snedecor para la comparación de parámetros.
s	Valores simulados de M_t/M_∞ obtenido con el modelo de parámetros individuales.
g	Valor promedio de la medida experimental.
q	Número total de mediciones.
\hat{n}	Número de parámetros estimados con el modelo global.

d	Número de parámetros estimados con el modelo de parámetros individuales.
MO	Pretratamiento con microondas.
ST	Sin pretratamiento con microondas.
D_i	Diámetro nominal de partícula (μm).
D_m	Diámetro medio de partícula (μm).
R^2_{ajus}	Coefficiente de determinación ajustado.
MD	Modelo de difusión.
t_{\min}/t'_{\min}	Tiempo mínimo.
F_0^{cd}	Estadístico de contraste para la comparación directa.
F_c^{cd}	Valor crítico de la distribución F de Snedecor para la comparación directa.
D_0	Constante pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius (m^2/s).
R_g	Constante de los gases (kJ/molK).
ΔE	Energía de activación (kJ/mol).
T_0	Temperatura promedio del rango estudiado (K).
C_1	Muestra de granos de canola utilizada por Fernández y col. (2012).
C_2	Muestra de granos de canola utilizada por Zárate y col. (2015).
C_3	Muestra de granos de canola utilizada en el Capítulo 3.
Z	Vector salida de la red neuronal.
z	Respuesta rendimiento de extracción de aceite relativo al rendimiento a tiempo infinito.
X	Vector de entrada a la red neuronal.
v_1	Categoría muestra de canola.
v_2	Categoría pretratamiento.
v_3	Variable temperatura (K).
v_4	Variable tiempo de extracción (s)
mse	Cuadrado medio del error.
$\text{tansig}(x)$	Función de activación tangente sigmoidea.
$\text{purelin}(x)$	Función de activación linear.

RMSE	Raíz del cuadrado medio del error.
R^2	Coefficiente de determinación.
φ	Coefficiente lineal de la recta de correlación.
ψ	Término independiente de la recta de correlación.
Et	Extracto total.
E	Extracto total libre de etanol.
FL	Fracción lipídica.
EIH	Fracción de extracto insoluble en n-hexano.
P1	Proceso de lavado con n-hexano.
P2	Proceso de separación de fases.
FL+Etanol	Fase rica en aceite.
EtF+Etanol	Fase rica en etanol.
FS	Fase sólida.
EtF	Solubles en la fase rica en etanol.
SH-EtF	Solubles en n-hexano de la fase rica en etanol.
CH	Contenido de carbohidratos (%bs).
P	Potencia ultrasónica absorbida (W).
IU	Intensidad de potencia ultrasónica aplicada (W/cm ²).
X_i	Valor codificado del <i>i-esimo</i> factor.
x_i	Valor natural.
x_{0i}	Valor natural del punto central.
Δx_i	Diferencia máxima de variables.
a_i	Valor máximo codificado.
Y_i	Respuesta predicha.
X_i	Variables independientes en valores codificados.
β_0	Coefficiente independiente.
β_i	Coefficientes lineares.
β_{ii}	Coefficientes cuadráticos.
β_{ij}	Coefficientes de interacción.
<i>Subíndices</i>	
0,1,2,...,n	numeración
0	etapa de lavado

∞ Tiempo infinito

t A tiempo t

Superíndices

d simulado.

cd comparación directa.

exp dato experimental.

pred dato predicho por el modelo.

mexp dato promedio experimental.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL Y MARCO TEÓRICO**1.1. INTRODUCCIÓN**

La calidad y estabilidad de los aceites vegetales resultan fundamentales para su aceptación y comercialización en el mercado. Actualmente, la producción agropecuaria se enfrenta a un desafío constituido, en su mayor parte, por la demanda de un mercado cada vez más exigente en los aspectos de calidad. Sin embargo, la calidad final del producto depende tanto de la calidad de la materia prima como de las condiciones de cosecha, almacenamiento, tratamiento antes de la extracción, métodos de extracción y condiciones de procesamiento.

El aceite de canola es uno de los aceite comestibles más consumido en el mundo. La canola (*Brassica napus* L.) es el cultivar de colza que contiene menos de 2% de ácido erúcico y posee un contenido de glucosinolatos menor a 30 $\mu\text{mol/g}$ de glucosinolatos en su harina desgrasada. La incorporación de la canola en el conjunto de las especies oleaginosas de nuestro país y especialmente de la región bonaerense, es interesante dado su ciclo invierno-primavera, que le permite acceder al mercado en distintas épocas del año, incrementando el abastecimiento de la industria y no superponiéndose con las demás especies oleaginosas. La Unión Europea es un potencial demandante de este aceite tanto para el consumo humano como para la producción de bio-combustible.

El grano de colza/canola contiene entre un 38 a 50% de un aceite que posee una muy baja proporción de ácidos grasos saturados (7%) y aporta

cantidades significativas de ácido α -linolénico (~10%) (Shahidi, 1990), ácido ω -3 esencial para el ser humano debido a que no puede sintetizarlo y es indispensable para su nutrición y salud, por lo que es requerido por los mercados más exigentes. Asimismo, contiene una interesante cantidad de antioxidantes, especialmente α - y γ -tocoferol (Ferrari y col., 1996). A su vez, en los últimos años se ha detectado la presencia de un potente antioxidante y antimutagénico, denominado canolol (4-vinilsiringol), en su aceite a partir de granos que han sido sometidos a un proceso térmico. Se han estudiado las propiedades de este compuesto para la prevención del cáncer (Cao y col., 2008), así como su capacidad para aumentar la vida útil del aceite de canola (Matthäus, 2012).

La obtención convencional de aceites a partir de granos oleaginosos se lleva a cabo industrialmente por prensado y/o extracción con solvente (n-hexano). El aceite en estos granos se encuentra dentro de membranas formando una emulsión y es necesario romper la estructura celular para permitir que se libere y sea más accesible para el solvente, facilitando también la extracción de componentes bioactivos. Los pretratamientos térmicos que se realizan a los granos modifican o rompen la estructura de modo que se facilita la liberación del aceite (Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015). En la actualidad existe un creciente interés por el empleo de nuevas tecnologías de pretratamiento y/o extracción, como son el uso de ultrasonido y microondas, tendientes a incrementar rendimientos, mantener o mejorar calidad de productos, acortar tiempos de extracción y disminuir el consumo de solventes orgánicos (Vilkhu y col., 2008; Azadmard-Damirchi y col., 2010; Ramos y col., 2017).

En la actualidad, la producción más limpia es un desafío creciente y de compromiso con un desarrollo sustentable. Es por ello, que el impacto que tienen los disolventes y sus residuos en el medio ambiente es un área de interés para la comunidad científica y tecnológica. Convencionalmente, el n-hexano (producto derivado del petróleo) es el disolvente más utilizado para la extracción de aceites vegetales por sus diversas cualidades, sin embargo, existen desventajas asociadas principalmente a cuestiones ambientales, de seguridad y de salud. Varios disolventes alternativos se han propuesto para reemplazar el n-hexano en la extracción de aceite vegetal incluyendo el uso de tricloroetileno, n-heptano, etanol, isopropanol y n-propanol (Gandhi y col., 2003; Seth y col., 2007; Andreotti y col., 2015; Baümler y col., 2016).

En virtud de las consideraciones realizadas, en la presente tesis se propone el estudio de los efectos que ejercen distintos procesos de la cadena agroindustrial sobre la calidad y/o extracción del aceite de colza/canola, evaluando nuevas alternativas tecnológicas, como son el empleo de ultrasonido y microondas, y de solventes amigables con el ambiente, como el etanol, para poder contribuir con una interesante información a ser transferida y aplicada en el sector socio-productivo.

1.2. MARCO TEÓRICO

1.2.1. ¿Por qué aceite de canola?

1.2.1.1. Canola (Colza 00)

La colza (*Brassica napus* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Brasicáceas (Crucíferas) que alcanza hasta 2 m de altura y

produce una semilla pequeña y redonda, de color negro, marrón o amarillo (**Figura 1-1**), de alto contenido de aceite (38-50%). Dado su elevado contenido en compuestos anti nutricionales como el ácido erúcico (22-60% en el aceite) y glucosinolatos, sus productos derivados como el aceite y la harina no son aptos para el consumo humano.



Figura 1-1. Granos de canola (*Brassica napus L.*) variedad invernall.

Con el objetivo de corregir los problemas asociados a los anti nutrientes, las variedades de colza fueron modificadas genéticamente. En 1968, en Canadá, se produjo por primera vez la colza de bajo contenido en ácido erúcico (LEAR), conteniendo 5% o menos de ácido erúcico en el aceite. Eventualmente estos granos fueron conocidos como variedad colza 0 y gradualmente fueron convertidos en variedades con bajo contenido de ácido erúcico y bajo contenido de glucosinolatos o variedades doble cero (00), obteniendo la licencia de estos cultivares en 1974. El nombre “Canola” se adoptó en 1979 en Canadá para definir a todos los cultivares doble cero, y en su más reciente definición, canola se refiere a todo cultivar de colza conteniendo menos de 2% de ácido erúcico en el aceite

y menos de 30 $\mu\text{mol/g}$ de uno o cualquier combinación de los glucosinolatos alifáticos en la harina desgrasada. Finalmente, en 1985 la Administración Estadounidense de Drogas y Alimentos (FDA) establece a la Canola como alimento GRAS (Reconocido generalmente como seguro, por sus siglas en inglés) (Shahidi, 1990).

Composición del grano de colza/canola

La composición aproximada de colza/canola varía entre las variedades como resultado tanto de factores genéticos como de las condiciones de crecimiento. El contenido de aceite de canola varía entre 38-50%, aproximadamente el doble que el de soja (Shahidi, 1990).

Los carbohidratos constituyen una proporción relativamente baja de los granos de colza y canola. Están presentes en los granos de diferentes formas y niveles variables. De acuerdo a Siddiqui y Wood (1977), la composición relativa de la fracción de polisacáridos de colza incluye 3,5% arabinogalactano, 6,9% arabinano, 15,5% amiloide, 24,1% celulosa y 50,0% de pectinas. La celulosa es el principal constituyente de la cáscara, acompañado por hemicelulosa y lignina. Los hidratos de carbono de bajo peso molecular representan aproximadamente el 48% de las materias solubles de colza en etanol al 80% (Siddiqui y col., 1973). La sacarosa es el principal azúcar soluble presente, mientras que la rafinosa y la estaquiosa se encuentran en cantidades más pequeñas (Shahidi, 1990).

Producción en Argentina

La colza/canola es un cultivo de áreas templado frías, siendo un importante componente para la rotación agrícola a los cereales de

invierno. La colza/canola, en planteos de siembra directa, permite la realización de cultivos de segunda tales como soja o maíz. Como se describió en la Introducción, la incorporación de la colza/canola en el conjunto de las especies oleaginosas de la región es importante dados los ciclos de cultivos que permite acceder al mercado en distintas épocas del año, incrementando el abastecimiento de la industria y sin superposiciones con otras oleaginosas.

En la **Figura 1-2** se muestra la producción de colza en la Provincia de Buenos Aires y en Argentina durante el período 1997-2017.

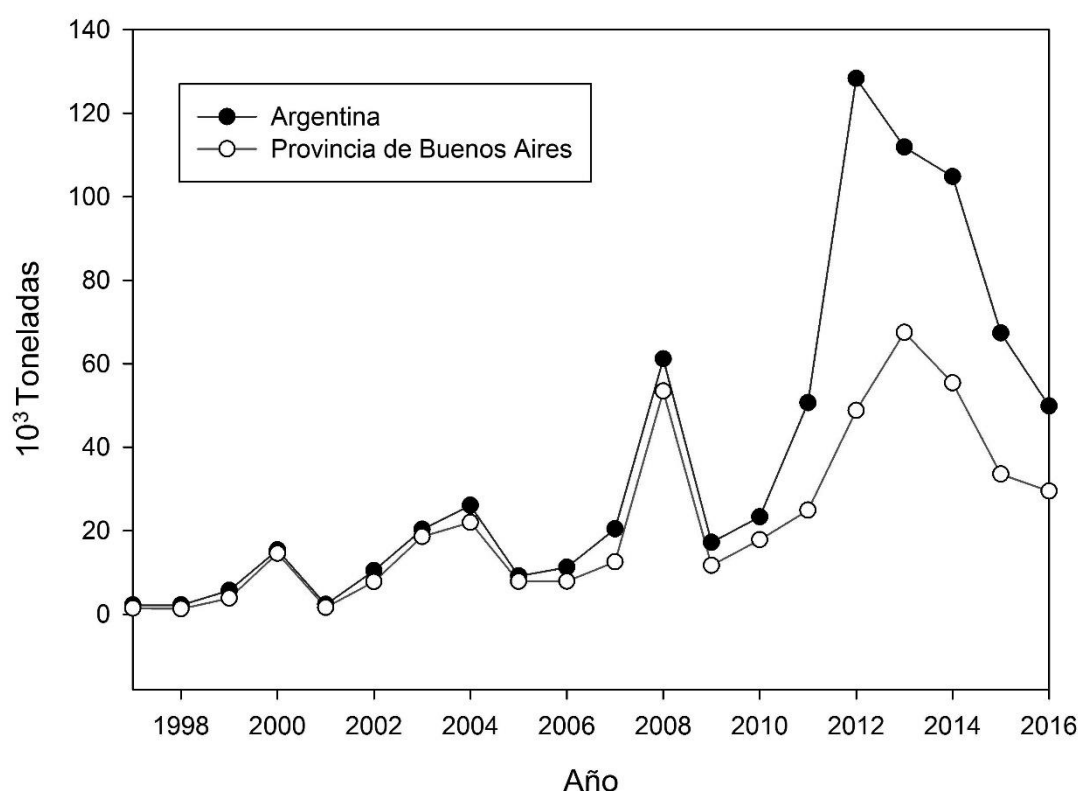


Figura 1-2. Producción de granos de colza en la Provincia de Buenos Aires y Argentina (Ministerio de Producción y Trabajo, 2019).

Como se observa en la **Figura 1-2**, hasta el año 2011 prácticamente la totalidad de la colza/canola del país se producía en la provincia de

Buenos Aires. Mientras que, en los últimos años se ha comenzado a cultivar en otras provincias, como La Pampa, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, y San Luis; no obstante ello, la provincia de Buenos Aires sigue siendo la principal productora.

Dada las características climáticas en el centro sur y sudeste de la provincia de Buenos Aires y este de La Pampa, se produce colza/canola de tipo invernal y primaveral. En esta región, las temperaturas permiten que se cumpla con las condiciones de frío que necesita el cultivo para completar con todas las etapas del desarrollo (Iriarte y Valetti, 2002).

Estos datos confirman la importancia de esta oleaginosa y el desarrollo de la industria asociada para el mercado productivo de la región centro de la provincia de Buenos Aires.

Con respecto al comportamiento de la producción de granos de colza/canola se observa una tendencia creciente en los últimos años, con un pico de producción en la campaña 2012/2013 posiblemente impulsado por el precio a nivel mundial tanto del grano como del aceite (hasta 560 y 1000 USD/ton respectivamente; Fondo Monetario Internacional, 2018). Hacia 2016 la cotización disminuyó hasta 330 USD/ton, coincidiendo con el período de merma en la producción.

Dado su alto contenido de aceite, la producción primaria tiene como principal destino la industria aceitera, tanto en el mercado interno como el de exportación.

1.2.1.2. Aceite de colza/canola

Antes de 1850 el aceite de colza se destinó originalmente al uso de lámparas de aceite, actualmente su principal destino es la producción de biodiesel, siendo la principal materia prima de este biocombustible producido en Europa. El biodiesel producido a partir del aceite de colza posee menores temperaturas de fusión que el producido a partir de otras materias primas, haciéndolo más adecuado para regiones frías (Peterson y col., 1997).

Con el desarrollo de la canola, el aceite se incorporó al mercado de alimentos como uno de los aceites saludables debido a su baja concentración de ácidos grasos saturados, adecuada relación de ácidos grasos insaturados y alto contenido de vitamina E. Es por ello, que se recomienda su consumo para la reducción de colesterol plasmático y la prevención de enfermedades cardíacas (Lin y col., 2013).

En los últimos años se ha comenzado a estudiar un compuesto fenólico denominado canolol, formado a partir de tratamientos térmicos aplicado a granos *Brassica* y detectado en ciertos aceites de colza/canola, por sus propiedades antioxidantes y potencialidad en la prevención de cáncer estomacal, constituyendo un compuesto de interés en la producción del aceite elevando potencialmente el valor agregado (Ver **Anexo A1**).

Producción Mundial

Regionalmente, el mercado puede segmentarse en Europa, Asia Pacífico, América del Norte y resto del mundo. Europa representa la parte dominante en el mercado del aceite de canola. También es el principal

productor de aceite de canola en el mundo. Entre los países del mundo, China ocupa el segundo lugar en términos de volumen de producción, mientras que Canadá lidera en términos de exportación total de aceite de canola, lo que hace que Asia Pacífico y América del Norte sean actores regionales destacados del mercado (FAO/OMS, 2019).

Desde 1987 el aceite de colza/canola se mantiene como el tercer aceite vegetal más producido en el mundo. En la **Figura 1-3** se muestra la producción mundial de aceite de colza/canola en el período 1997-2014.

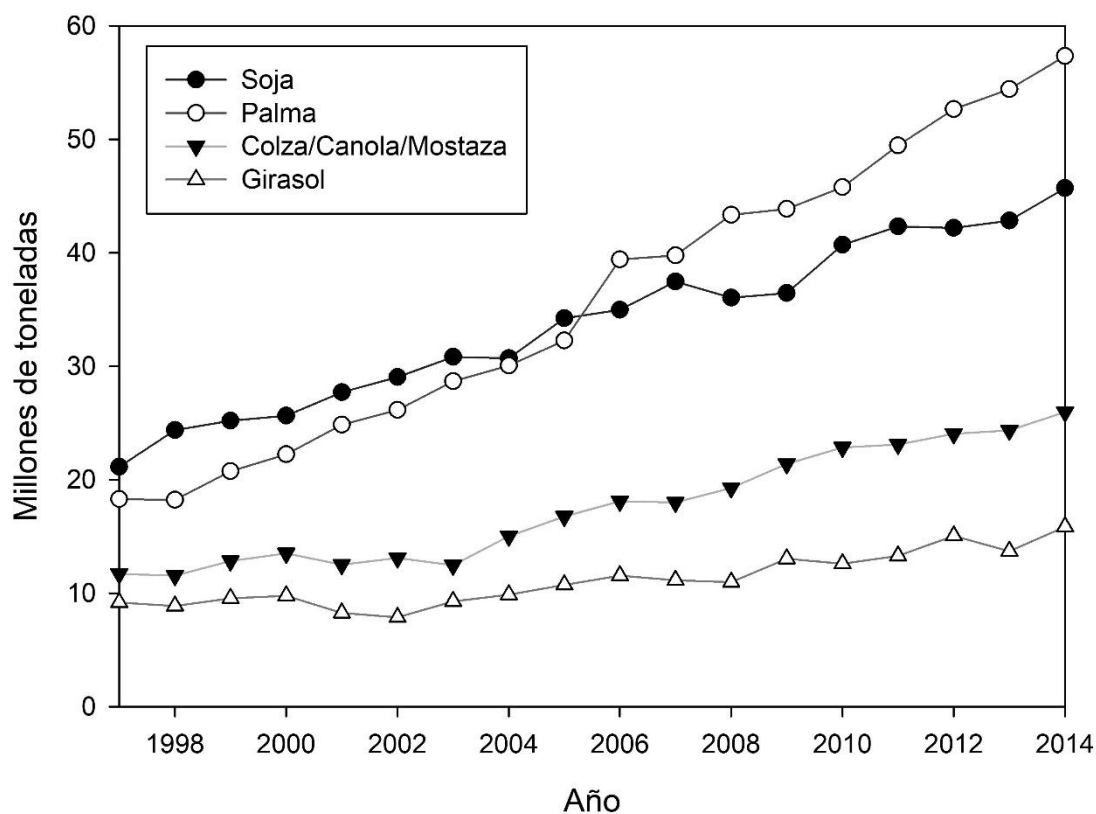


Figura 1-3. Producción mundial de los principales aceites vegetales (FAO/OMS, 2019).

La producción mundial de aceite a partir de los granos *Brassica* (Colza, Canola, Mostaza) presenta, al igual que el aceite de soja y palma, una

tendencia creciente alcanzando los 30 millones de toneladas en el año 2013.

1.2.2. Definición del problema

1.2.2.1. Producción de aceite de colza/canola en Argentina

En la **Figura 1-4** se muestra la producción de aceite de colza/canola en Argentina desde 1997 a 2014 (FAO, 2019) y la producción potencial estimada calculada a partir de los datos de producción de granos (considerando un contenido de aceite estimado de 43%).

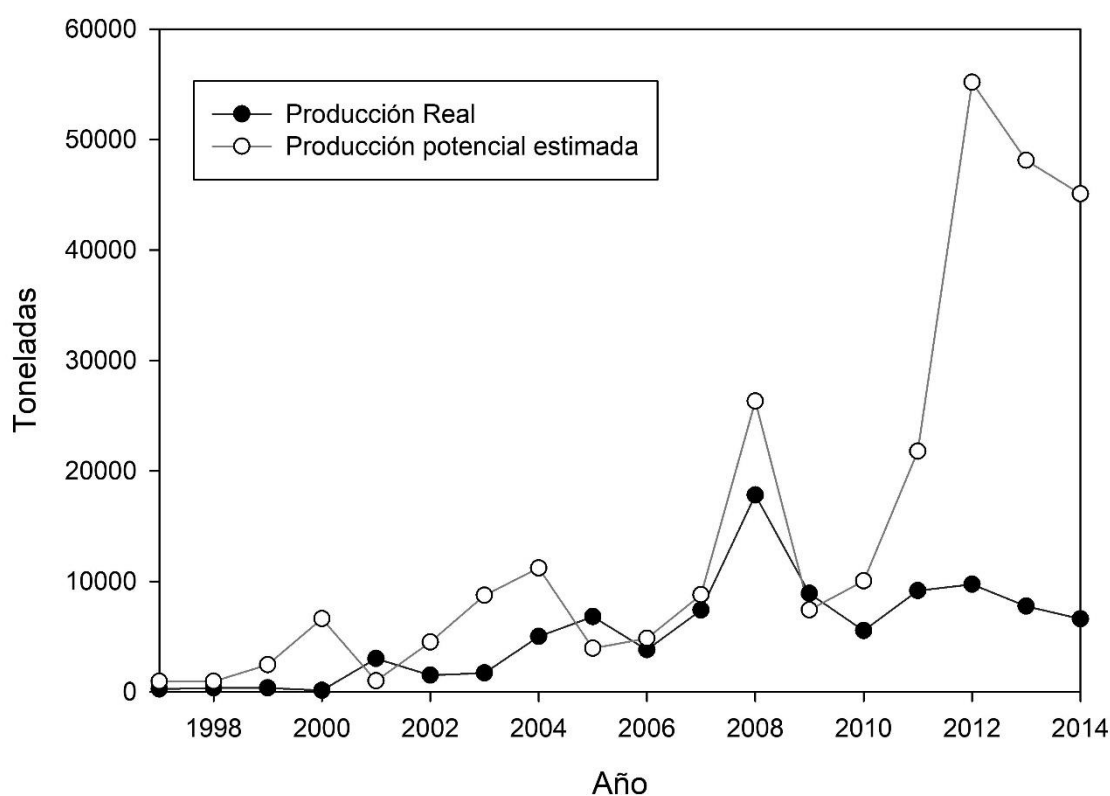


Figura 1-4. Producción real (FAO/OMS, 2019) y potencial calculada de aceite de colza en Argentina en el período 1997-2014.

A partir de lo observado en la **Figura 1-4** se podría inferir que hasta el año 2009 la mayor parte de la producción de granos de colza/canola se

destinó a la industria aceitera local, mientras que a partir del 2010 la mayor parte de la producción de granos no se destinó a la industria aceitera local, posiblemente impulsado, como se describió anteriormente, por la suba en los precios de los granos. Estos resultados muestran una baja capacidad de la industria aceitera para absorber la producción de granos de colza/canola. A su vez, mientras que la cotización del grano disminuyó a partir del 2013, el precio del aceite se mantuvo alrededor de 1000 USD/ton (Fondo Monetario Internacional, 2018), duplicando el valor del grano. Por estos motivos resulta relevante abordar la problemática relacionada a la extracción de aceite de colza/canola en orden de favorecer el procesamiento industrial del grano en el país y fomentar la exportación de productos de mayor valor agregado.

1.2.2.2. Obtención de aceite

El proceso de extracción de aceite de canola por lo general incluye etapas de limpieza de la semilla, pre-acondicionamiento mecánico-térmico (molienda o laminado, cocción del grano) y extracción propiamente dicha, donde convencionalmente se utiliza una operación de prensado para quitar mecánicamente una porción del aceite y la posterior extracción por solvente de la pasta comprimida, para obtener el resto del aceite. A su vez, la harina residual de extracción pasa por una etapa de desolventizado para su posterior utilización.

En la **Figura 1-5** se muestra un esquema de las operaciones involucradas.

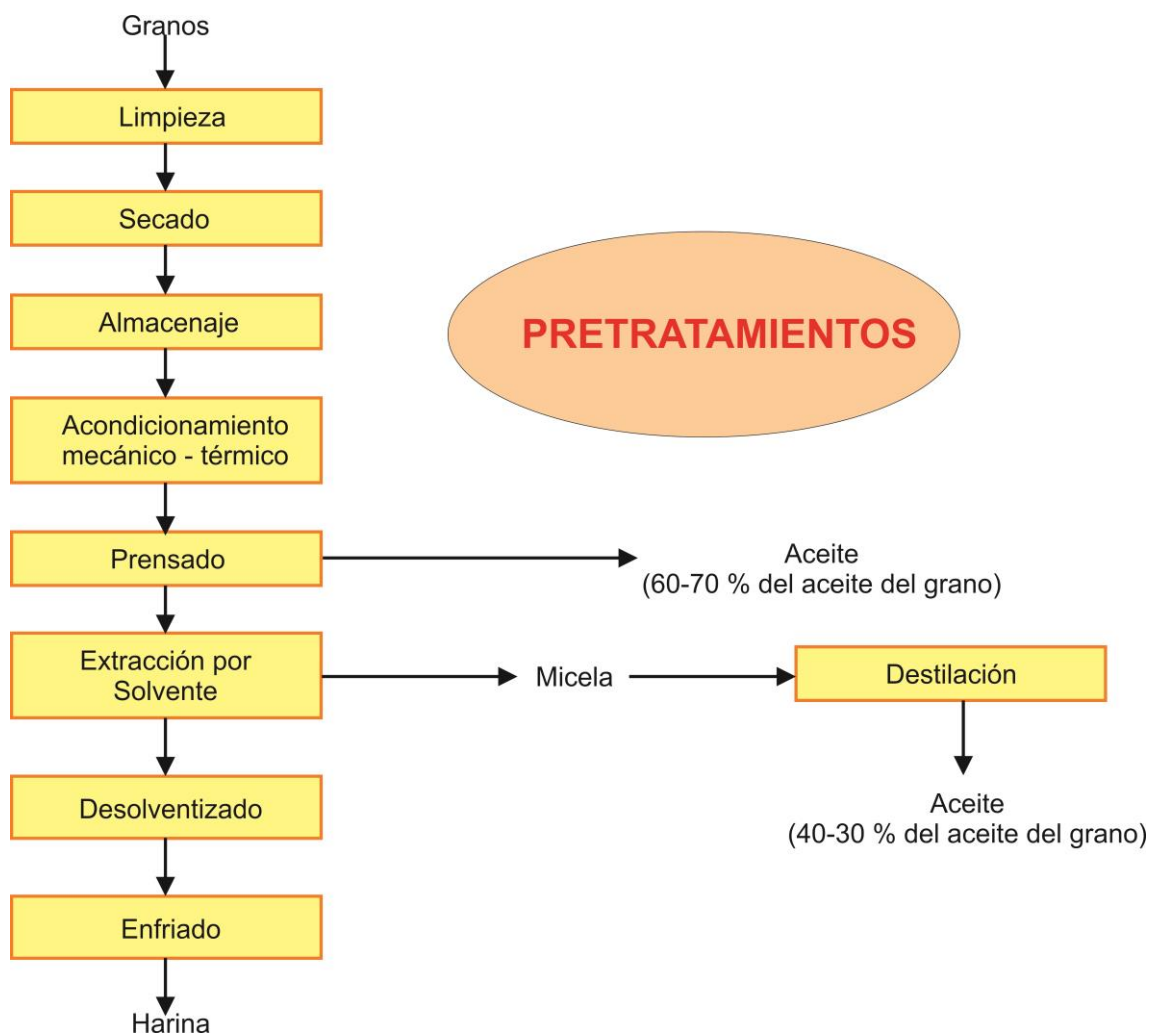


Figura 1-5. Diagrama de flujo de un proceso convencional de extracción de aceite de canola.

Pretratamientos convencionales

El aceite de semillas oleaginosas se encuentran en vacuolas intracelulares, dentro de la membrana celular, enlazado a proteínas y a una amplia variedad de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, etc.) formando cuerpos lipídicos (Demarco, 2009). La conformación de las microestructuras celulares juega un papel importante afectando la permeabilidad de los solutos. Asimismo, estos materiales contribuyen a la retención de humedad, evitando que el solvente acceda a sitios activos para la extracción del aceite (Fernández y

col., 2008). Por ello, para facilitar la extracción de aceite con solvente es necesario romper las paredes y membranas celulares de las mismas a fin de facilitar la accesibilidad del solvente al aceite. Esto puede lograrse aplicando pretratamientos mecánicos y térmicos (Grasso, 2006).

Dentro de los pretratamientos más utilizados se encuentran el laminado, molienda, cocción y/o expandir.

El objetivo de la operación de laminado es producir láminas delgadas con elevada área superficial mediante el pasaje de los granos por rodillos lisos y producir la ruptura de las células oleíferas, permitiendo un contacto simple de los lípidos con el solvente para una rápida y eficiente extracción.

Por su parte, la molienda permite reducir el tamaño del grano y romper las microestructuras, facilitando la liberación del aceite y reduciendo la distancia a recorrer por el aceite desde el seno del grano hacia la superficie.

Con la operación de cocción se busca la desnaturalización de las proteínas, favoreciendo un posterior prensado de los granos (evitando la emulsión aceite-proteína) y la ruptura de las células oleíferas, facilitando la liberación del aceite para su posterior extracción por prensado y/o solvente. Habitualmente la cocción se lleva a cabo en cocinadores por inyección de vapor, no obstante esta operación tiene altos requerimientos energéticos y la exposición prolongada de los granos a la temperatura disminuye la calidad del aceite y harina finales.

El expandir es un equipo que consta de tornillo que gira en un cilindro en cuyo extremo se instala una matriz por donde sale el material

procesado en el mismo (collets), con estructura densa y textura altamente porosa. A lo largo del cilindro se insertan varias entradas para la inyección de vapor directo al material. El uso de expender permite incrementar la densidad aparente del material acondicionado, el cual presenta mayor permeabilidad a la micela en el extractor, disminuyendo el requerimiento de solvente y originando una menor retención del mismo en la harina residual.

Recientemente se ha estudiado la aplicación de pretratamientos hidrotérmicos en granos de canola previos a la extracción por prensado (Cortese y col., 2017) y previos a la extracción sólido-líquido utilizando n-hexano como solvente (Zárate y col., 2015); en ambos casos el pretratamiento favoreció la apertura de las estructuras, facilitando la liberación del aceite y reportando una mayor velocidad de extracción.

Extracción por prensado

El prensado se realiza en un equipo denominado prensa, compuesto de un eje giratorio dentro de un barril ranurado. El material (granos enteros, laminados o molidos) ingresa al equipo y es comprimido por el eje compactándolo y liberando el aceite que fluye a través de las ranuras del barril. La pérdida de masa se compensa con un incremento en el diámetro del eje y una reducción en el paso del mismo (Mattea, 2001). Habitualmente, se logra una extracción del 60-70% del aceite del grano mediante esta operación. El proceso de prensado puede realizarse con temperaturas superiores a 40 °C (prensado en caliente) o menores (prensado en frío). Generalmente se obtienen mayores rendimientos con

el prensado en caliente, sin embargo en los últimos años se ha difundido el prensado en frío para la obtención de aceite de canola debido a la percepción de mejores propiedades nutricionales en el aceite que en los obtenidos por otros métodos (Ghazani y col., 2014).

Extracción por solvente

La extracción por solvente es el proceso de extracción convencional industrial de aceite crudo a partir de granos oleaginosos con mayor eficiencia. Los procesos basados en extracción por solvente consisten, usualmente, en extracciones sucesivas del material oleaginoso previamente “preparado” (quebrado, laminado, molido, expandido o prensado, entre otros) a partir del contacto en contracorriente con n-hexano donde la transferencia de masa y el lavado superficial son los fenómenos principales (Demarco, 2009). Luego, la harina desengrasada es llevada a un desolventizador para recuperar el solvente. El solvente es removido del aceite en evaporadores de efecto múltiple y tecnología de recuperación de capa fina con vapor bajo vacío (Demarco, 2009).

Los extractores comerciales disponibles operan a partir de dos métodos básicos de contacto para disolver el aceite en el solvente. El primer método se denomina inmersión, en el cual el material sólido queda sumergido totalmente en el solvente. El segundo es el método de percolación, donde el solvente es esparcido desde la parte superior del lecho de granos pretratado, a una velocidad determinada por la resistencia del lecho al flujo por gravedad del solvente.

A grandes rasgos, los extractores se clasifican en “tipo de inmersión total” y “tipo de percolación”, que por lo general tienen una sección co-corriente y filtrado inicial, seguido de una sección que opera a contracorriente. Ejemplos de los tipos de inmersión son los extractores Hildebrandt y los antiguos extractores desarrollados por Anderson y Allis-Chamers. Por su parte, los extractores de “tipo percolación” de uso comercial más utilizado en Argentina son los extractores De Smet, Crown Dravos y Bollmann (Rataus, 2001). Estos extractores pueden trabajar con lecho poco profundo ($<1\text{m}$) dependiendo de su capacidad. Asimismo, se pueden mencionar el extractor tipo rotatorio fabricado por French también denominado “Extractor Reflex”, que opera como lecho profundo (siendo la altura del material en las canastas de aproximadamente 3 metros) (Shahidi, 2005); el extractor desarrollado por Blaw-Knox y los extractores que operan por filtración (Chang, 2016).

Factores que influyen en la extracción por solvente

El aceite dentro de las células de oleaginosas puede encontrarse en una zona cercana a la pared celular, siendo fácil de extraer en muy poco tiempo de contacto entre el solvente y el material a extraer. Por otro lado, una parte del aceite deberá recorrer mayor distancia para alcanzar la pared celular y poder ser arrastrado por el solvente hasta la corriente de la micela. En el trayecto el aceite se encontrará con diferentes “obstáculos” (carbohidratos, paredes celulares, etc.) a los que le tomará tiempo poder superar. Es por eso que tanto los pretratamientos aplicados que permitan romper las estructuras como el tiempo de contacto durante

esta operación de extracción es importante, independientemente del tipo de extractor utilizado (Demarco, 2009).

Dado que los procesos de disolución y difusión no suceden instantáneamente, el tiempo de extracción es uno de los factores que influyen en la velocidad de extracción por solvente. El tiempo necesario depende de la clase de grano, los pretratamientos aplicados y el equipo utilizado. La temperatura de extracción también es importante ya que el aumento de la temperatura disminuye la viscosidad e incrementa la solubilidad del extracto. Menores viscosidades y mayores solubilidades resultan en mayores velocidades de extracción. El aumento de la temperatura no sólo afecta la velocidad de extracción sino también la proporción entre los componentes lipídicos y no-lipídicos en el aceite crudo extraído (Demarco, 2009).

Aspectos ambientales y de seguridad

El principal aspecto ambiental relacionado con la extracción convencional basada en solventes es la pérdida de n-hexano y los problemas asociados a su polución. El n-hexano, dentro de la clasificación de los VOCs (compuestos orgánicos volátiles), puede reaccionar con sustancias tóxicas, principalmente óxidos de nitrógeno, en presencia de luz solar, para producir ozono (O_3) y otras especies conocidas colectivamente como oxidantes fotoquímicos (Grasso, 2013). Hay dos tipos de ozono, el ozono estratosférico y el ozono a nivel del suelo. El ozono estratosférico es vital para la salud humana porque filtra los rayos ultravioletas procedentes del sol. Es importante entender que los

disolventes no toman parte en el problema estratosférico del ozono, esto es debido a que ellos, como las emisiones naturales de VOCs, desaparecen rápidamente de la atmósfera baja a partir de reacciones fotoquímicas. Esto significa que nunca alcanzan la estratosfera. Sin embargo, el ozono a nivel del suelo en la troposfera es un componente clave del smog fotoquímico, empobreciendo la calidad del aire, que puede tener un efecto perjudicial sobre la salud y la vida de las plantas.

La industria alimenticia es responsable de aproximadamente el 7,5% de las emisiones de VOCs, siendo el sector aceitero uno de los principales actores (Grasso, 2013). Hacia 1980 Mustakas (1980) estimó una emisión promedio de 1,5 L de n-hexano por tonelada de semilla procesada para plantas industriales. Es por ello que resulta interesante la búsqueda de alternativas para la extracción de aceites que permitan reducir o eliminar el uso de VOCs y sus niveles de emisión a la atmosfera.

Además de los problemas ambientales, el uso de n-hexano es también peligroso desde el punto de vista de la seguridad. El n-hexano es altamente inflamable y se deben tomar precauciones que eviten los riesgos de explosión, fuego y el peligro de accidentes severos.

1.2.3. Alternativas

1.2.3.1. Tecnologías emergentes

Day y Schoemaker (2000) definen a las tecnologías emergentes como “Innovaciones basadas en la ciencia que tienen el potencial de crear una nueva industria o transformar una ya existente. Incluyen innovaciones discontinuas derivadas de innovaciones radicales, así como más

tecnologías evolutivas formadas por la convergencia de flujos de investigación previamente separados.” En un análisis detallado de la bibliografía de los últimos años que abordan la temática, Rotolo y col. (2015) identificaron cinco características principales que definen a una tecnología como emergente:

- Novedad Radical
- Crecimiento relativamente rápido
- Coherencia
- Impacto prominente
- Incertidumbre y ambigüedad

Dentro de esta definición se pueden incorporar los denominados procesos de extracción “verdes”. Mientras que una definición general de procesos verde es la invención, diseño y aplicación de procesos para reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas (Chemat y col., 2012); en relación con la extracción verde de productos naturales, esta definición fue modificada por Chemat y col. (2012) de la siguiente manera: “La extracción verde se basa en el descubrimiento y diseño de procesos de extracción que reducen el consumo de energía, permite el uso de solventes alternativos y productos naturales renovables, y garantiza un uso seguro y de alta calidad del extracto / producto ”.

Estas tecnologías tales como: la aplicación de altas presiones, ultrasonidos, irradiación, así como pulsos de campos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes y luz blanca de alta intensidad ofrecen nuevas alternativas para el procesamiento de alimentos (Changala Magdaleno, 2012).

En este contexto, y dada la problemática abordada en las secciones anteriores, ciertas tecnologías emergentes podrían introducirse en el proceso de extracción de aceite de canola; tanto en las etapas de pretratamiento como en la extracción propiamente dicha para desarrollar de esta forma procesos “verdes”.

En el marco de la presente tesis se abordan como tecnologías emergentes:

- La aplicación de microondas como pretratamiento a la extracción.
- El uso de un solvente “verde” en la extracción (Etanol).
- La aplicación de Ultrasonido en la extracción.

Microondas

Las microondas son parte del espectro electromagnético en el intervalo de frecuencia comprendido entre las zonas del infrarrojo y las ondas de radio (300 MHz-300 GHz); dicho intervalo corresponde a longitudes de onda entre 1 m y 1 mm. Generalmente operan a frecuencias de 2450 MHz y 915 MHz (Changala Magdaleno, 2012).

Se generan en el magnetrón, dispositivo que transforma la energía eléctrica en un campo electromagnético. Cuando se aplican a los alimentos, la polaridad del campo electromagnético que se origina cambia de dirección varios millones de veces por segundo. Así, los componentes polares e ionizables (agua y sales minerales, principalmente) intentan orientarse con la dirección de dicho campo electromagnético, produciéndose fricciones y choques entre las moléculas que dan lugar a un aumento de la temperatura en el interior del alimento, este hecho, es el que diferencia el calentamiento con microondas de los tratamientos

térmicos tradicionales (Ramos, 2014). Una vez que se genera calor en el alimento, éste se transmite por conducción y convección térmica a través de toda su superficie. El agua, grasas y otras sustancias presentes en los alimentos absorben la energía de las microondas en un proceso llamado calentamiento dieléctrico (Changala Magdaleno, 2012), visto esquemáticamente en la **Figura 1-6**.

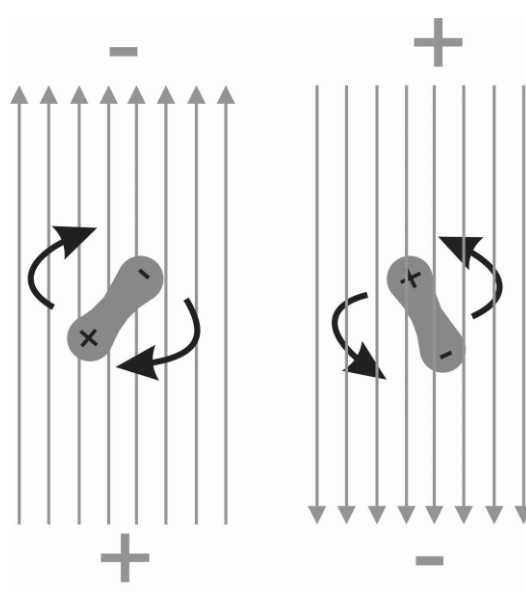


Figura 1-6. Movimiento de las moléculas en un campo de microondas.

La propiedad de penetración de las microondas, en ciertos materiales, provee la oportunidad de reducciones importantes en los tiempos de proceso en la industria, incluso permiten una disminución del tiempo de calentamiento en relación de diez a uno; asimismo los procesos por microondas pueden demandar requerimientos de energía mucho menores a los de un proceso convencional (Changala Magdaleno, 2012). Se ha observado que el empleo de radiación microondas en oleaginosas conduce a mayores rendimientos de aceites con menores tiempos de extracción (Azadmard-Damirchi y col., 2010) y mayor estabilidad termo-

oxidativa de los mismos como resultado de un elevado contenido de antioxidantes (US Patent N°. 5,591,772, 1997). Además, se ha observado un importante incremento en la extracción de vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y/o carotenoides a partir de salvado de arroz (Duvernay y col., 2005) y semilla de cáñamo (Oomah y col., 2002), así como la inactivación de la enzima mirosinasa y la descomposición de glucosinolatos en colza, generando harinas de mejor calidad nutricional (Tripathi y Mishra, 2007).

Etanol

El etanol es un solvente obtenido biotecnológicamente que no genera residuos tóxicos y no afecta la salud. La posibilidad del uso de este solvente para la extracción de aceites vegetales y sus solubilidades, entre ellos el aceite de colza, ha sido estudiada en décadas previas (Rao y Arnold, 1956). No obstante, dada la baja solubilidad del aceite en etanol, la industria aceitera se inclinó por un solvente de menor punto de ebullición y mayor poder solubilizante como el n-hexano. En la búsqueda de solventes alternativos o “verdes”, el etanol adquiere importancia dado el crecimiento del bioetanol o etanol producido a partir de materia orgánica y de su incorporación en los combustibles.

Particularmente en Argentina, la producción de etanol principalmente se obtiene a partir del maíz y la caña de azúcar. Argentina tiene 14 plantas importantes elaboradoras de etanol, tanto las que obtienen etanol por el procesamiento de caña de azúcar como aquellas que lo logran por la molienda de maíz. Nuestro país utiliza entre 1,2 y 1,4 millones de

toneladas de maíz para obtener etanol combustible (Calzada y Di Yenno, 2017). En la **Figura 1-7** se muestra la producción de bioetanol en Argentina de los últimos 8 años.

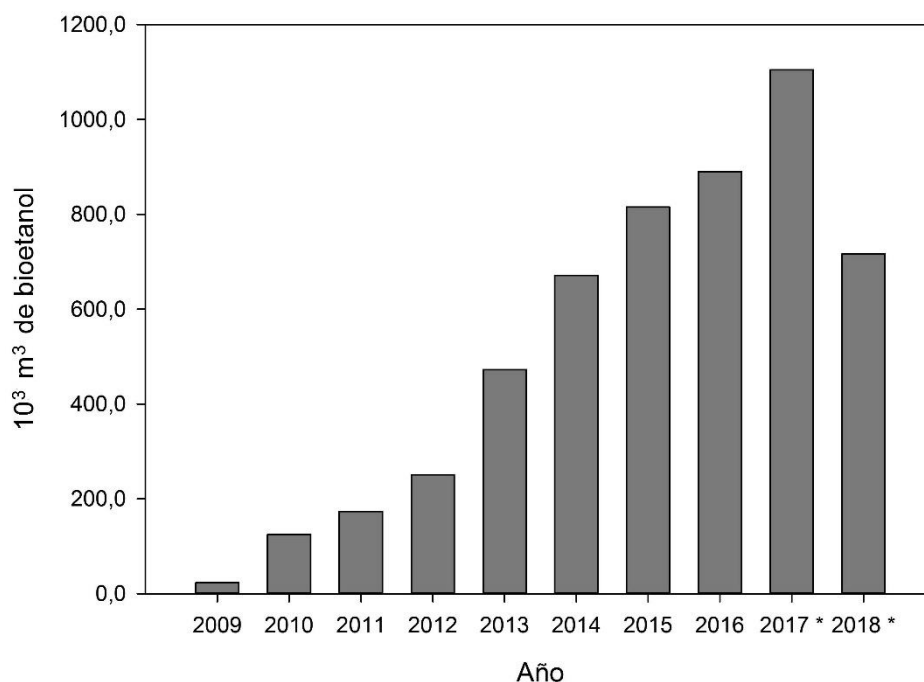


Figura 1-7. Producción de bioetanol en Argentina (Ministerio de Hacienda^a, 2018). * Datos provisorios Septiembre de 2018.

Como muestra la **Figura 1-7**, la producción de bioetanol se encuentra en crecimiento, impulsado entre otros por el aumento del porcentaje de bioetanol en combustibles previsto según la Ley de biocombustibles 26.093 (InfoLEG Información Legislativa, 2018).

Factibilidad económica

Si bien tanto la condición de solvente sustentable como las estadísticas de producción muestran que el bioetanol es una alternativa interesante para reemplazar solventes como el n-hexano en la industria aceitera, cabe destacar que actualmente el precio del etanol es aproximadamente 30%

menor al del n-hexano industrial (0,5 y 0,65 USD/L, respectivamente (Global Chemical Price, 2014; Ministerio de Hacienda^b, 2018).

Con respecto a la purificación del solvente luego de la extracción, Uyazán y col. (2006) han estudiado la deshidratación del etanol mediante una destilación extractiva utilizando glicerol, un residuo de la industria del biodiesel, reportando un consumo energético menor a los diferentes métodos utilizados convencionalmente; siendo hasta un 36% menor con respecto a una destilación extractiva con ciclon-hexano (proceso convencional de purificación).

Los resultados observados sugieren la posibilidad de la existencia de alternativas económicas y sustentables para la incorporación de etanol en un proceso de extracción de aceite.

Ultrasonido

El ultrasonido puede definirse como ondas acústicas inaudibles de una frecuencia superior a 20 kHz. Las ondas de ultrasonido son generadas por vibraciones mecánicas de frecuencias mayores a 18 kHz, las cuales pueden llegar hasta los 5 MHz en gases o los 500 MHz en líquidos y sólidos (Kuldiloke, 2002). La aplicación de fuerzas sinusoidales sobre la superficie de un material puede generar bien sea ondas de compresión, si la fuerza aplicada es perpendicular a la superficie del material, u ondas de corte, si por el contrario la fuerza aplicada es paralela a la superficie del material.

El efecto del ultrasonido está asociado a los fenómenos complejos de cavitación gaseosa, que explican la generación y evolución de

microburbujas en un medio líquido. La cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente. Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo experimenta una compresión. El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces (se expanden) en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado (**Figura 1-8**).

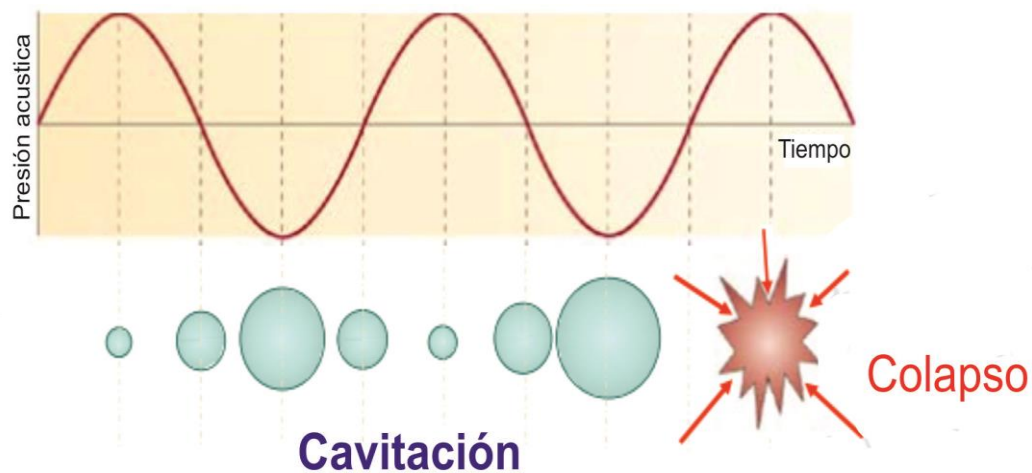


Figura 1-8. Formación de las microburbujas y colapso.

Dada la gran amplitud del intervalo en el cual se pueden encontrar, las ondas de ultrasonido se subdividen en dos tipos: de alta frecuencia y de baja frecuencia. Mientras que el ultrasonido de alta frecuencia suele

utilizarse en el campo médico para el análisis de imágenes, el análisis químico y en estudios de fenómenos de relajación; el ultrasonido de baja frecuencia o alta intensidad, utiliza niveles de potencia más altos (en el rango de 10-1000 W/cm²) que generan intensos gradientes de presión, temperatura y corte dentro del material sobre el cual actúan y por lo tanto alteran su estructura y reactividad química (Changala Magdaleno, 2012). Los usos benéficos del ultrasonido radican en el efecto físico, mecánico y químico que causan sobre el alimento facilitando fenómenos como el rompimiento celular, la desgasificación de líquidos, la homogenización de emulsiones y la dispersión de materiales agregados entre otros (Suslik y Shoh, 1998); es así que una de las mayores aplicaciones del ultrasonido es la extracción, tanto de compuestos orgánicos como de inorgánicos, de diversos tipos de muestras.

1.3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Considerando las problemáticas y antecedentes mencionados se presentan a continuación el objetivo general, los objetivos específicos y las hipótesis que se van a desarrollar en la presente tesis.

1.3.1. Objetivo general

Estudiar los efectos que ejercen distintos procesos de la cadena agroindustrial sobre la calidad y la cinética de extracción del aceite de colza/canola.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del pretatamiento mediante microondas de granos de canola sobre índices de calidad y componentes menores (tocoferol y canolol) del aceite obtenido utilizando el proceso de extracción sólido-líquido (n-hexano).
2. Estudiar la cinética de extracción del aceite por solvente (n-hexano) de los granos de canola pretratados mediante microondas y desarrollar un modelo que explique el fenómeno.
3. Comparar los resultados obtenidos de los estudios de la cinética de extracción del aceite de granos de canola pretratados con microondas con la cinética de extracción obtenida en granos molidos de canola y de canola pretratada hidrotérmicamente (realizado en trabajos previos) y desarrollar un modelo único para las distintas condiciones.
4. Estudiar y definir las etapas necesarias para llevar a cabo el proceso de extracción sólido-líquido, empleando como solvente etanol, del aceite de granos molidos de canola, comparando estos procesos con la extracción sólido-líquido con n-hexano.
5. Estudiar el efecto del pretratamiento mediante microondas de granos de canola sobre el rendimiento, índices de calidad y componentes menores (tocoferoles y canolol) del aceite obtenido utilizando el proceso de extracción sólido-líquido (etanol).

6. Optimizar el proceso de extracción sólido-líquido (etanol) asistido por ultrasonido de aceite de canola a partir de granos pre-acondicionados mediante microondas.
7. Estudiar el efecto del empleo de ultrasonido durante el proceso de extracción sólido-líquida de aceite de canola, utilizando etanol como solvente, sobre el rendimiento, índices de calidad y componentes menores (tocoferoles y canolol) de la fracción lipídica.

1.3.3. Hipótesis

Hipótesis I: La aplicación de pretratamiento mediante microondas modifica la cinética de extracción con n-hexano del aceite de canola a partir de granos molidos.

Hipótesis II: El empleo de etanol como solvente en el proceso de extracción sólido-líquido de canola permite obtener rendimientos de aceite similares a los alcanzados usando n-hexano.

Hipótesis III: La cinética de extracción de aceite de canola con etanol difiere de la correspondiente al empleo de n-hexano.

Hipótesis IV: El pretratamiento con microondas del grano de canola influye en el rendimiento de extracción y en las propiedades (calidad) del aceite obtenido con etanol como solvente de extracción.

Hipótesis V: La asistencia mediante ultrasonido mejora el rendimiento de aceite por extracción con solvente (etanol) de granos de canola pretratados con microondas, sin afectar propiedades del mismo.

CAPITULO 2

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS SOBRE LA CALIDAD Y COMPONENTES MENORES DEL ACEITE

2.1. INTRODUCCIÓN

Los aceites y grasas comestibles están compuestos principalmente por triacilgliceroles (TAG), ésteres con una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos. Según Shahidi (2005) los TAG constituyen del 94,4% al 99,1% del aceite de canola (colza con menor al 2% de ácido erúcico, C22:1). La reducción del ácido erúcico en el aceite de colza dio como resultado un marcado incremento de los ácidos octodecanoicos, ácidos con 18 carbonos, que contribuyen aproximadamente el 96% del total de los ácidos presentes en el aceite. Por lo general, el aceite de canola contiene aproximadamente 4% de ácidos palmítico, 2% de esteárico, 62% de oleico, 22% de linoleico y 10% de α -Linolénico, siendo uno de los aceites vegetales con más bajo contenido de ácidos grasos saturados totales (Shahidi y col., 1990). Los ácidos linoleico (ω -6) y α -linolénico (ω -3) son esenciales para el ser humano debido a que no puede sintetizarlos, siendo indispensables para su nutrición y salud. La FAO (World Health Organization, 1993) recomienda una relación máxima de 5:1 a 10:1 entre los ácidos grasos polinsaturados ω -6 y ω -3, presentando el aceite de canola una relación óptima (aproximadamente 2:1) para la salud humana (Ratnayake y Daun, 2004).

El aceite de canola posee un nivel relativamente alto de fitoesteroles; siendo el segundo en contenido de fitoesteroles totales entre los aceites comestibles tradicionales, superado por el aceite de maíz (McDonald, 2012). Dentro de sus antioxidantes naturales se destacan los tocoferoles (vitamina E), siendo los isómeros predominantes el γ -tocoferol y α -tocoferol. En la **Tabla 2-1** se muestra la composición de tocoferoles en diferentes aceites vegetales, incluyendo colza de alto y bajo contenido de ácido erúsico.

Tabla 2-1. Contenido de tocoferoles en distintos aceites vegetales.

Aceite	Isómeros del tocoferol ($\mu\text{g/g}$)			
	α	β	γ	δ
HEAR	268	-	426	-
LEAR	260	-	613	-
Soja	90	-	680	230
Cártamo	600	-	-	-
Girasol (refinado)	608	17	11	-
Maní	169	5.4	144	13
Maíz	134	18	412	39
Algodón	402	1,5	572	7,5
Oliva	140	-	-	-

HEAR: Aceite de colza de alto contenido de ácido erúsico. LEAR: Aceite de colza de bajo contenido de ácido erúsico. Extraído de Shahidi (2005).

Como se describió en el Capítulo 1, el canolol es un compuesto fenólico con propiedades bioactivas y antioxidantes, presente en aceite canola el cual se genera por efecto de un tratamiento térmico sobre los granos. Autores como Spielmeyer y col. (2009), Azamard-Darmichi (2010) y Matthaüs (2012), entre otros, reportaron el contenido de canolol en aceite de canola sometida a pretratamientos con microondas.

Existen diferentes métodos para la determinación de canolol basados en la extracción de compuestos fenólicos por metanol/agua (Vuorela y col., 2005) y su determinación por HPLC. Por otro lado, como el canolol muestra una buena solubilidad en disolventes no polares como éter de petróleo o n-hexano, es posible determinarlo en aceite de canola junto con los tocoferoles. En la **Tabla 2-2** se muestran diferentes técnicas de determinación de canolol junto con tocoferoles. La determinación de canolol utilizando un estándar externo requiere disponer del compuesto purificado. Además de la disponibilidad comercial del canolol (aproximadamente 900 dólares por gramo), existen alternativas como la purificación del mismo a partir de extractos obtenidos de los granos (Wakamatsu y col., 2005; Spielmeier y col., 2009) y la síntesis a partir de distintos precursores de menor costo comparativo (Simpson y col., 2005; Matthaüs y col., 2012; Shrestha y col., 2012; Zago y col., 2015).

Tabla 2-2. Métodos de determinación de tocoferoles y canolol por HPLC.

Fase estacionaria	Fase móvil	Estándar	Flujo	Detector	Referencias
Lichrospher 100NH2	1,2% Isopropanol /N-hexano	Interno PMC	1,2 mL/min	Fluorescencia	Wakamatsu y col. (2005)
Nucleosil 100 NH2	96% N-hexano/ Isopropanol	Externo	1 mL/min	Arreglo de diodos	Spielmeier y col. (2009)
Diol	99% n-Heptano/ Ter-butil eter	Interno PMC	1,3 mL/min	Fluorescencia	Matthaüs (2012)
LiChroCART 250-4,6 Purospher STAR Si	99,1% N-hexano/ Isopropanol	Externo	1 mL/min	Fluorescencia	Shrestha y col. (2012)

PMC: 2,2,5,7,8 pentamethyl-6-chromanol

Pretratamiento con microondas

El pretratamiento con microondas ha comenzado a usarse en alimentos con diversos objetivos, desde reducir la carga microbiana hasta facilitar el procesamiento posterior acortando los tiempos. En comparación con otros tratamientos térmicos, las microondas presentan la ventaja de preservar mejor las propiedades organolépticas, nutricionales y funcionales (Contreras y col., 2017), no obstante la energía aplicada en matrices biológicas como los granos podría acelerar procesos de oxidación.

La aplicación de microondas con el fin de facilitar la extracción de componentes ha sido estudiada por varios autores. Uquiche y col. (2008) estudiaron la extracción de aceite de avellanas chilenas previamente tratadas con microondas, registrando un aumento en la estabilidad oxidativa del aceite debido probablemente a inactivación de enzimas. Azadmard-Damirchi y col. (2010), mostraron que el tratamiento con microondas previo a la extracción de aceite de colza por prensado mecánico, aumenta el rendimiento de extracción, mejora la estabilidad e incrementa significativamente el contenido de antioxidantes. Por su parte, Ramos y col. (2017), cuando optimizaron el proceso de extracción sólido-líquido (n-hexano) de granos de canola pretratados con microondas, no detectaron efecto significativo de este pretratamiento sobre el índice de acidez y el contenido de tocoferoles del aceite. Sin embargo, evidenciaron una reducción del índice de peróxido por efecto

del microondas y el incremento de un compuesto, presumiblemente canolol.

Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar los granos utilizados en la tesis y evaluar el efecto del pretatamiento mediante microondas de granos de canola sobre índices de calidad y componentes menores (tocoferoles y canolol) del aceite obtenido utilizando el proceso de extracción sólido-líquido (n-hexano).

En primer lugar se describe la caracterización de los granos de canola utilizados a lo largo de la tesis. Luego, se analiza la influencia de un pretratamiento con microondas de los granos de canola sobre índices de calidad y componentes menores del aceite extraído, a partir de la determinación del valor de acidez, el índice de peróxidos, el índice de p-anisidina, el valor Totox, la composición de ácidos grasos y el contenido de tocoferoles y canolol. Para la determinación de canolol y tocoferoles se desarrolló una técnica empleando Ultra-Cromatografía Líquida de alta Presión (UHPLC) y sintetizando canolol para su utilización como estándar externo.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se contó con una partida de 10 kg de granos de canola variedad invernal suministrados por la empresa AL HIGH TECH S.R.L. (Argentina), la cual se utilizó para llevar a cabo toda la tesis.

2.2.1. Caracterización de los granos de canola

2.2.1.1. Determinación de humedad

El contenido de humedad fue evaluado según la técnica de AOCS Ba 24-38 (Firestone, 1998). Se pesaron 10 g de canola en una cápsula de aluminio, los cuales fueron secados en una estufa de circulación forzada (Drying oven DHG-9123A, China) durante 4 h a 130 °C. La muestra se llevó a temperatura ambiente en un desecador antes de determinar su peso. El procedimiento se realizó por triplicado. El porcentaje de humedad en base seca (%bs) se calculó según la ecuación (2.1):

$$H = \frac{P_h - P_s}{P_s} \times 100 \quad (2.1)$$

Donde:

P_h: peso de la muestra antes del calentamiento (g).

P_s: peso de la muestra después del calentamiento (g).

2.2.1.2. Determinación del contenido de aceite

El contenido de aceite se estimó siguiendo la norma IUPAC 1.122 (IUPAC, 1992). Los granos fueron molidos utilizando un molinillo de cuchillas de laboratorio (Moulinex, cuchillas horizontales, Argentina) durante 60 s. Luego se dispusieron 30 g de muestra molida en cartuchos de papel Whatman N° 3. Se utilizó n-hexano grado técnico (BIOPACK, ≥98.5%) como solvente en un equipo Soxhlet con ciclos térmicos, durante 8 horas en una primera etapa y luego etapas de 2 horas hasta peso constante. El proceso se efectuó a una temperatura de 68-72 °C y a presión atmosférica. El solvente fue removido del aceite utilizando un rotavapor R-114 (Büchi, Suiza) a 40 °C y a presión reducida. El contenido de aceite fue

determinado gravimétricamente y expresado como porcentaje en peso sobre base seca.

2.2.1.3. Determinación del contenido de proteínas

Se utilizó el método Macro-Kjeldahl según norma AOCS Ai 4-91 (Firestone, 1998), con un destilador BÜCHI (Model 435, Switzerland). La harina residual se digirió con ácido sulfúrico concentrado utilizando sulfato de cobre/sulfato de potasio como catalizador para convertir el nitrógeno en iones amonio. Se añadió álcali para liberar el nitrógeno, el cual se destiló en exceso de ácido bórico. El destilado se tituló con ácido clorhídrico para determinar el amonio absorbido por el ácido bórico. La muestra se colocó en el tubo del digestor BÜCHI junto con 10 g de catalizador, una mezcla al 7% de sulfato de cobre con sulfato de potasio. Luego se añadieron 25 mL de ácido sulfúrico concentrado y se procedió al calentamiento. Se preparó en forma paralelo un blanco. Una vez que la solución se aclaró asegurándose que toda la materia orgánica se oxidó se agregaron 100 mL de agua.

Para la destilación se preparó una solución de ácido bórico al 4% a la que se añadió una solución indicadora. Ésta se preparó con 0,02 g de rojo de metilo y 0,04 g de verde de bromocresol disueltos en 19 mL de alcohol y 1 mL de agua destilada. La proporción de solución indicadora fue de 5 mL por litro de ácido bórico al 4%. Se colocaron 50 mL de esta solución ácida preparada en un erlenmeyer y se colocó a la salida del condensador para recoger el amonio destilado. Se añadió a la muestra digerida hidróxido de sodio al 30% para liberar el amonio, hasta que la solución

tomó una coloración azul intensa. Para determinar el amonio absorbido por el ácido bórico se tituló el destilado con ácido clorhídrico 0,1 N.

El porcentaje de nitrógeno se calculó según la ecuación (2.2):

$$\%N = \frac{[(V_1 - V_B) \cdot N_{HCl}] \cdot 0,014}{w_1} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Donde:

V_1 : mL de HCl consumidos en la titulación de la muestra.

V_B : mL de HCl consumidos en la titulación del blanco.

w_1 : peso de muestra en gramos, expresado en base seca.

N_{HCl} : normalidad de la solución de HCl.

El contenido de proteína bruta se obtuvo multiplicando el valor de nitrógeno por un factor de 6,25.

2.2.1.4. Determinación del contenido de fibra cruda

Se determinó el contenido de fibra cruda siguiendo la norma AOCS Ba 6-84 (Firestone, 1998). La muestra desgrasada w_1 (2 g) se colocó en un erlenmeyer de 1 L al cual se le añadió 200 mL de solución de H_2SO_4 0,255 N, previamente calentada hasta ebullición, y unas gotas de alcohol n-amílico como antiespumante.

El dispositivo se conectó a un refrigerante. Se hirvió suavemente durante 30 minutos, agitando periódicamente el erlenmeyer. Posteriormente se filtró el contenido a través de un embudo preparado con una malla metálica (ASTM N° 200). El residuo fue lavado con agua hirviendo para eliminar el ácido y luego se llevó al matraz original y se agregó 200 mL de solución de NaOH 0,313 N, precalentada hasta ebullición, y se hirvió durante 30 minutos siguiendo el procedimiento antes descripto. El

residuo fue lavado con agua hirviendo y posteriormente se lavó con 15 mL de etanol 96%. Luego se colocó en un crisol Gooch N° 1, previamente colocado en una mufla a 600 °C durante 2 horas, enfriado y tarado. El crisol con el residuo se colocó en una estufa a 105 °C hasta peso constante. Se dejó enfriar y se pesó (w_2).

Luego el residuo se incineró en una mufla a 600 °C durante 1 hora. Nuevamente se dejó enfriar y se pesó (w_3).

El contenido de fibra cruda en porcentaje (%FC) se determinó según la ecuación (2.3):

$$\%FC = \frac{(w_2 - w_3)}{w_1} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Donde:

w_1 : peso en gramos de la muestra, expresada en base seca.

w_2 : peso en gramos del residuo insoluble.

w_3 : peso en gramos de cenizas.

2.2.1.5. Determinación del contenido de cenizas

La determinación de cenizas se basó en la técnica AOCS Ba 5a-49 (Firestone, 1998). Se calentó 2 g de muestra sobre tela metálica con mechero hasta residuo carbonoso y se llevó a mufla a 550 °C hasta obtener un residuo blanquecino (aproximadamente 2 h). El contenido de cenizas se expresó como porcentaje en peso de harina seca (según la ecuación 2.4).

$$\%cenizas = \frac{w_2}{w_1} \cdot 100 \quad (2.4)$$

Donde:

w_1 : peso de la muestra seca.

w_2 : peso de la muestra calcinada.

2.2.1.6. Determinación del contenido de carbohidratos

Se determinó el contenido de carbohidratos como extracto libre de nitrógeno (ELN) calculado por diferencia usando la ecuación (2.5):

$$ELN = 100 - (\text{aceite} + \text{proteína} + \text{fibra cruda} + \text{cenizas}) \quad (2.5)$$

2.2.2. Pretratamiento y obtención de aceites

2.2.2.1. Calibración del microondas

Para la aplicación del pretratamiento con microondas se utilizó un microondas BGH Quick Chef (modelo 36960, Argentina). El microondas fue calibrado para verificar la potencia consumida calentando una cantidad conocida de agua en el microondas durante 60 segundos, y luego registrando el incremento de temperatura con un termómetro digital Tektronix (USA) (Arballo y col., 2010). Aproximadamente 1 kg de agua se distribuyó en 5 recipientes Pyrex (10 cm de diámetro), de forma similar a como se colocará la muestra de canola en los experimentos subsecuentes. El procedimiento se realizó por triplicado.

La potencia absorbida por el agua se calculó con la ecuación (2.6):

$$PA = m_w C_{pw} \frac{\Delta T}{\Delta \theta} \quad (2.6)$$

Donde:

PA : potencia absorbida por el agua (W).

m_w : masa de agua (kg).

C_{pw} : calor específico (J/°C kg).

ΔT : diferencia de temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

$\Delta \theta$: tiempo de exposición (s).

La potencia absorbida por el agua a 100% de la potencia de microondas calculada fue de 607 W. Cabe destacar que se registró un desvío estándar promedio de 1,4 $^{\circ}\text{C}$ entre las mediciones de cada cápsula.

2.2.2.2. Pretratamiento de las muestras con microondas

Se siguió el procedimiento optimizado por Ramos y col. (2017). La muestra se secó hasta una humedad de $5,7 \pm 0,2\%$ bs en una estufa de convección forzada a 35 $^{\circ}\text{C}$, a fin de no cambiar la calidad del aceite debido al proceso de secado. Se seleccionó la humedad considerando la óptima para pretratamientos con microondas de granos de canola informado en bibliografía (Ramos y col., 2017). La muestra se dividió en dos partes (submuestras), una de las cuales se irradió con microondas usando el siguiente procedimiento: 45 g de submuestra se dividió en 5 recipientes de Pyrex y se colocó en el interior del microondas (BGH Quick Chef, modelo 36960, Argentina), y se trató durante 5 min a una frecuencia de 2450 MHz a 100% de potencia (correspondiente a 607 W de potencia absorbida. Se alcanza una temperatura final en los granos aproximada de 102 $^{\circ}\text{C}$ (Ramos, 2014)). El procedimiento se repitió hasta obtener la cantidad de muestra de granos necesaria para pruebas posteriores, la cual fue homogeneizada. La muestra no irradiada se denominará muestra sin pretratar.

2.2.2.3. Obtención de aceite

Las muestras pretratadas y sin pretratar fueron molidas en un molinillo de café (Molinox, Argentina) y posteriormente se realizó para cada muestra la extracción del aceite con n-hexano en un dispositivo Soxhlet a partir de 20 g de muestra inicial durante 4 horas, tiempo de extracción óptimo determinado por Ramos y col. (2017). La micela obtenida (aceite y solvente) se recogió en un balón y el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio R-3000 Büchi (Suiza). Para eliminar el resto de n-hexano residual, los balones se colocaron bajo una corriente de nitrógeno hasta registrar peso constante. Para todos los aceites obtenidos a lo largo de la tesis los mismos se almacenaron en frascos color caramelo con atmósfera de nitrógeno a 4 °C hasta su utilización, previo a su empleo se deja alcanzar la temperatura ambiente.

2.2.3. Caracterización de los aceites

2.2.3.1. Determinación de tocoferoles y canolol (3,5-dimethoxy-4-hidroxibenzaldehído)

Síntesis del patrón estándar de canolol a partir de siringaldehído

La metodología utilizada para la síntesis del compuesto se adaptó a partir de los procedimientos descriptos por Shrestha y col. (2012) y Zago y col. (2015); a partir de la reacción que se muestra en la **Figura 2-1**:

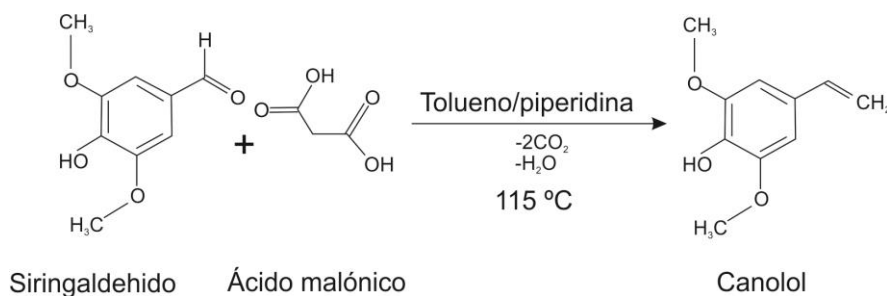


Figura 2-1. Reacción de síntesis del canolol.

Siendo siringaldehído y ácido malónico los reactivos, tolueno el solvente y piperidina el catalizador.

Se colocaron 1,86 g (10 mili moles) de siringaldehído (ALFA AESAR, 98%), 4,63 g (40 mili moles) de ácido malónico (ICN, 98%) y 15,2 mili moles (1,5 mL) de piperidina (Riedel de Haën, 98%) en un erlenmeyer de 250 mL, los cuales fueron disueltos en 42 mL de tolueno (ABERKON QUÍMICA, 99,5%).

El medio de reacción se mantuvo bajo agitación magnética (200 rpm) y calentando a 115 °C con reflujo durante 4 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se evaporó bajo presión reducida en un equipo rotavapor. Para eliminar las trazas de piperidina se agregaron 40 mL de tolueno al precipitado resultante y luego el solvente fue evaporado, la etapa se repitió tres veces.

El precipitado resultante se disolvió en 20 mL de etil acetato (ANEDRA, 99,5%) y se lavó tres veces con una solución saturada de cloruro de sodio (50 mL cada lavado) en una ampolla de decantación. Transcurrido el lavado la fase orgánica se separó de la acuosa y se secó adicionando sulfato de sodio, se filtró y se concentró. Finalmente se purificó utilizando una bureta de 100 mL rellena con silica gel, utilizando como fase móvil

se utilizó una solución de n-hexano y etil acetato (2:1), que fue inyectada con una propipeta para aumentar la presión. Luego el solvente se evaporó bajo vacío, obteniendo el compuesto canolol como precipitado.

Con el fin de incrementar la pureza se realizó una etapa de cristalización. Se preparó una solución saturada del compuesto sintetizado en n-hexano a temperatura ambiente, adicionando gotas de n-hexano grado HPLC (J.T. Baker, 95%) al sólido hasta su completa disolución, y se indujo la cristalización colocando la solución dentro de un freezer (-23 °C). Los cristales blancos formados fueron separados de la solución madre y secados bajo corriente de nitrógeno. La etapa de cristalización se repitió dos veces, obteniendo el sólido que se observa en la **Figura 2-2**. Se obtuvo un rendimiento del 16,3%. El canolol se almacenó en solución de n-hexano grado analítico en un frasco color caramelo, con cabeza de nitrógeno a -23 °C en orden de mejorar su conservación.



Figura 2-2. Compuesto 3,5-dimethoxy-4-hidroxibenzaldehido (canolol) sintetizado y purificado.

La pureza del compuesto sintetizado se analizó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía gaseosa acoplada

a un espectrómetro de masa (GC/MS) y Ultra cromatografía líquida de alta presión (UHPLC).

Análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)

Siguiendo el procedimiento descrito por Zago y col. (2015) el compuesto sintetizado se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,96%, ALDRICH) y se analizó utilizando un espectrómetro 300 MHz Avance Bruker Digital NMR (USA), operando a 300 MHz para ^1H y 75,5 MHz para ^{13}C . La asignación de las resonancias de carbono y protón, la identificación y caracterización de la estructura de los productos se realizó con experimentos D NMR análisis de espectro, homonuclear ^1H y heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$. Los desplazamientos químicos se referenciaron usando señales internas residuales de CDCl_3 a 7,26 ppm y 77,0 ppm para ^1H y ^{13}C , respectivamente. Los desplazamientos químicos de RMN del compuesto de interés se dan en la **Figura 2-3** y **Tabla 2-3**.

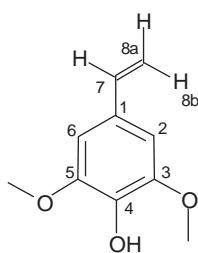


Figura 2-3. Estructura molecular del canolol.

Tabla 2-3. Desplazamientos químicos RMN del compuesto sintetizado (canolol).

Posición	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
1	-	129,21
2,6	6,65 (2H, s)	103,05
3,5	-	136,83
4	5,52 (1H, s)	134,83
7	6,62 (1H, dd)	147,08
	$J_{7,8b}=17,5$ Hz	
	$J_{7,8a}=10,8$ Hz	
A	5,15 (1H, dd)	
	$J_{7,8a}=10,7$ Hz	
8b	5,60 (1H, dd)	111,84
	$J_{7,8b}=17,5$ Hz	
	$J_{8b,8a}=0,5$ Hz	
OCH ₃	3,91(6H, s)	56,27

El compuesto de interés se identificó como 2,6-dimetoxi-4-vinilfenol y el patrón de fragmentación confirmó la estructura propuesta.

Análisis por cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (GS/MS)

La descripción del equipo y condiciones de trabajo adaptadas a partir de las condiciones utilizadas por Morley y col. (2013) se especifican en la

Tabla 2-4.

Tabla 2-4. Condiciones de trabajo empleadas (GS/MS) en la determinación del compuesto sintetizado (canolol).

Cromatógrafo	GC Thermo Quest Trace 2000 CG (USA)
Columna	Columna capilar de 30 m. 0,32 mm i.d., 0,25 µm de espesor de película, ZB-5HT Inferno (5% fenyl-95% dimetilpolysiloxano, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm de espesor de película).
Detector	detector de trampa de iones Finnigan Polaris Ion trap MS (USA) con línea de transferencia a 210 °C y fuente de iones a 200 °C
Gas Carrier	Helio
Velocidad de flujo	1 mL/min
Programación de temperatura	60 °C durante 2 minutos y luego programado a 10 °C/min y hasta 230 °C durante 10 minutos.
Software	Software Xcalibur

El cromatograma y espectro se muestran en las **Figuras 2-4 y 2-5**.

La molécula de canolol (m/z 180, molécula madre) fragmenta a 165, 137, 123, y 94 m/z (Morley y col., 2013), lo cual es comparable con los valores obtenidos en el presente estudio.

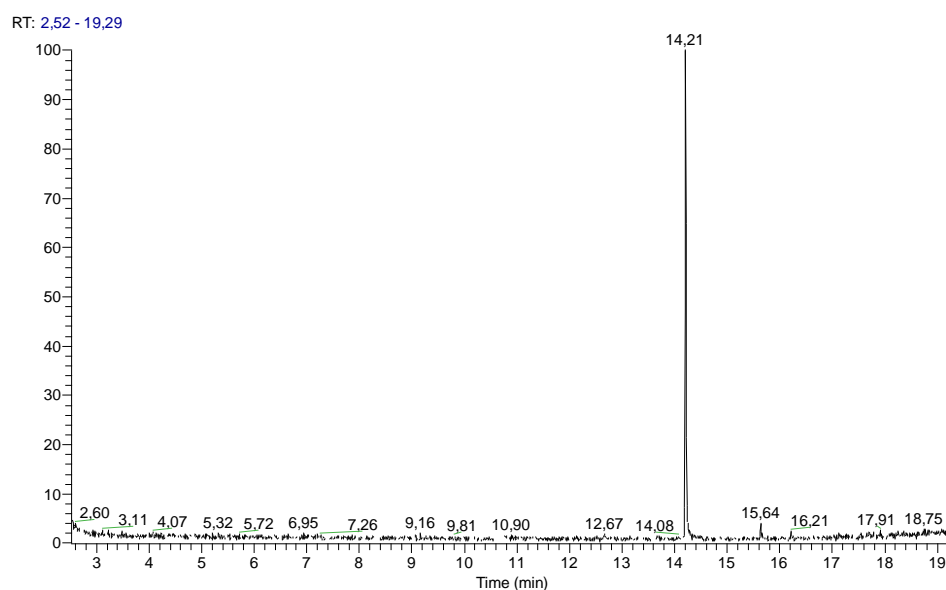


Figura 2-4. Cromatograma (GC) del compuesto sintetizado (canolol).

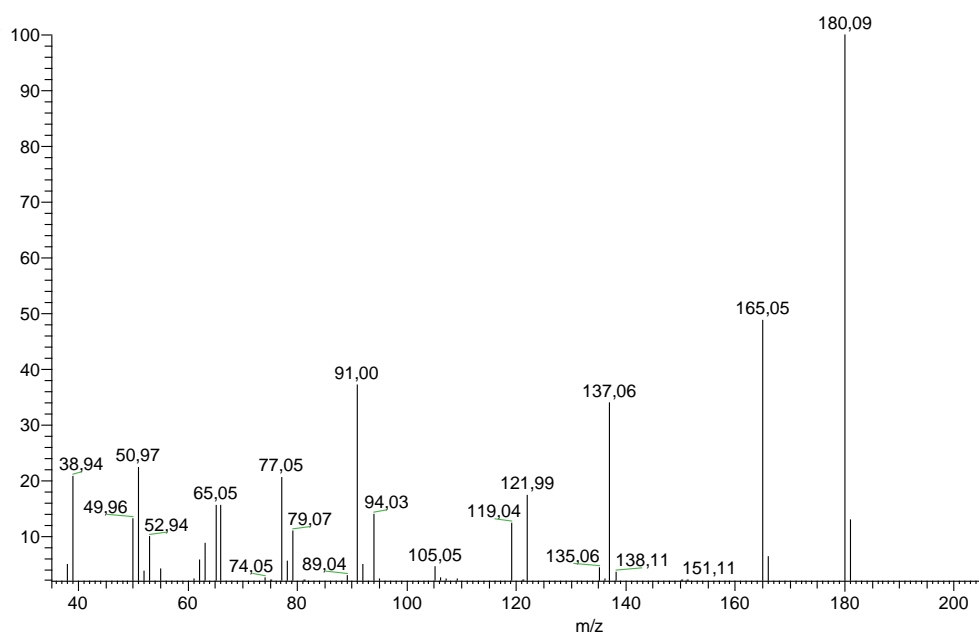


Figura 2-5. Espectro de masa del compuesto sintetizado (canolol).

Análisis por cromatografía líquida de alta presión (UHPLC)

La descripción del equipo y condiciones de trabajo adaptadas a partir de las condiciones descritas por Wakamatsu y col. (2005) se especifican en la **Tabla 2-5**.

Tabla 2-5. Condiciones de trabajo empleadas (UHPLC) en la determinación canolol.

Cromatógrafo	UHPLC Dionex Ultimate 3000 chromatographer Thermo Scientific (Alemania)
Columna	Luna NH2 100 column 250 x 4,6 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula; Phenomenex
Detector	Detector de fluorescencia Agilent, 1100 Series Fluorescence Detector G1321A, (USA), λ excitación/emisión 290/330 nm
Fase móvil	N-hexano:Isopropanol, 96:4 (v/v)
Velocidad de flujo	2,5mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Software	Software Chromeleon.

El cromatograma se muestra en la **Figura 2-6**.

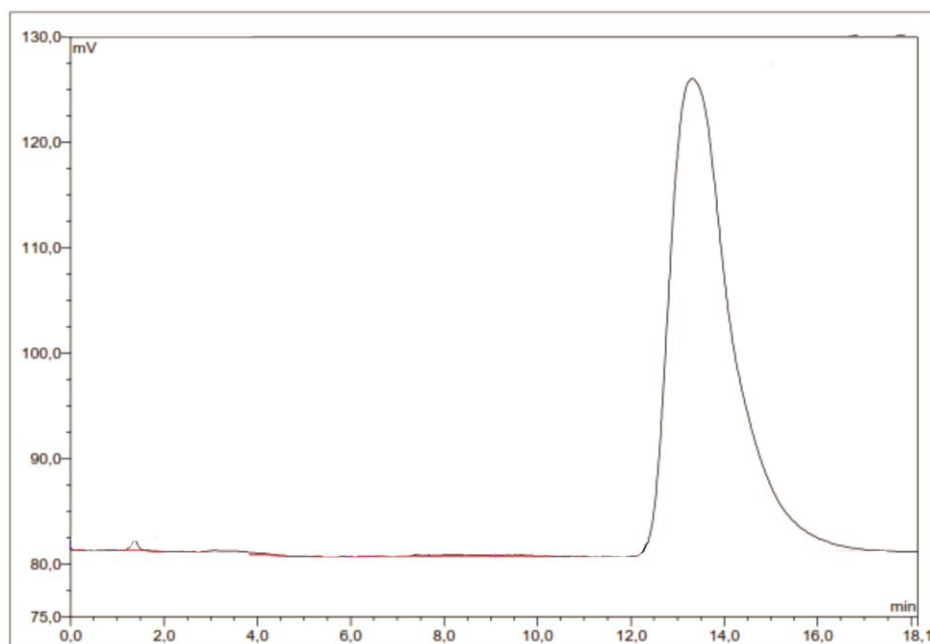


Figura 2-6. Cromatograma UHPLC del compuesto sintetizado (canolol).

El tiempo de retención del compuesto se aproxima al reportado por Wakamatsu y col. (2005) para el canolol en condiciones similares de trabajo.

Determinación de tocoferoles y canolol por UHPLC

La muestra de aceite (0,15 g) se disolvió en n-hexano grado HPLC homogeneizando la solución con ultrasonido. Se envolvieron los recipientes con papel aluminio para proteger las muestras de la luz.

El contenido de tocoferoles y canolol se determinó por el método del estándar externo, utilizando α -tocoferol (Sigma T#3251, 95%) y canolol (compuesto sintetizado) como referencia y se expresaron en $\mu\text{g/g}$.

La descripción del equipo y condiciones de trabajo para el Análisis cromatográfico se especificaron en la **Tabla 2-5**.

Curvas de calibrado

Los tocoferoles fueron cuantificados en relación al α -tocoferol, en base a una curva de calibración acorde al método estándar AOCS Ce 8-89 Note 3 (Firestone, 1998).

Se preparó una solución de α -tocoferol con 10 mg diluidos en 100 mL de n-hexano. Para determinar la concentración real de esta solución se tomó una alícuota de 10 mL y se la colocó en un frasco color ámbar. El n-hexano se evaporó con una corriente de nitrógeno y se añadieron 10 mL de metanol. Se midió la absorción de la solución a una radiación cuya longitud de onda fue de 292 nm en un Espectrofotómetro Mapada UV 1800 PC (China). El valor obtenido se lo dividió por 0,0076 (valor establecido por el método, Firestone, 1998) dando como resultado la concentración en $\mu\text{g/mL}$.

A partir de esta solución patrón se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para realizar la curva de calibrado a partir de una regresión lineal. Los resultados de la calibración se muestran en la **Tabla 2-6**. El rango donde se cumple la relación lineal con el detector de fluorescencia es 0,4-40 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2-6. Recta de calibración de los tocoferoles.

Concentración (C) ($\mu\text{g/mL}$)	Área (A)	Recta de calibración
0,000	0,00	$C = 0,20103756.A$ $R^2 = 0,9988$
4,033	21,56	
8,066	40,64	
12,099	58,68	
16,132	80,67	

Por su parte, el canolol fue cuantificado en base a una curva de calibración utilizando el estándar sintetizado. Se pesó 0,04 g del compuesto sintetizado y se disolvió en 25 mL de n-hexano dando como resultado una solución de 1600 µg/mL de concentración. A partir de esta solución patrón se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para realizar la curva de calibrado. Los resultados de la calibración se muestran en la **Tabla 2-7**.

Tabla 2-7. Recta de calibración del canolol.

Concentración (C) (µg/mL)	Área (A)	Recta de calibración
0,000	0,000	C= 0,02675643.A R ² = 0,9998
0,456	17,930	
0,912	35,069	
1,824	66,343	
3,648	136,489	
4,560	170,723	

El contenido de canolol y tocoferol presentes en el aceite, expresados en µg/g se calcularon mediante las ecuaciones (2.7) y (2.8), respectivamente:

$$canolol = [canolol] \cdot \frac{V}{m} \quad (2.7)$$

$$\alpha - Toc = [\alpha - Toc] \cdot \frac{V}{m} \quad (2.8)$$

Donde:

[canolol]: Concentración de canolol en µg/mL calculado a partir de la recta de calibrado.

[α -Toc]: Concentración del tocoferol en µg/mL calculado a partir de la recta de calibrado.

V: volumen de la muestra en mL.

m: peso del aceite en g.

2.2.3.2. Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas-líquido siguiendo la metodología descrita por Izquierdo y col. (2002).

La cromatografía gas-líquido es un método analítico que requiere el uso de esteres metílicos de los ácidos grasos, los cuales se obtienen por metanólisis alcalina de los triglicéridos seguida por una esterificación de los ácidos grasos libres en medio ácido.

Los componentes se identificaron por comparación de los tiempos de retención con soluciones patrón de metil-ésteres de ácidos grasos.

Las condiciones de operación se resumen en la **Tabla 2-8**.

Tabla 2-8. Condiciones de trabajo empleadas en la determinación de ácidos grasos por cromatografía gas-líquida

Cromatógrafo	Shimadzu GC-2014 (Japón)
Columna	Columna capilar DB-23 x 60 m x 0,25 mm
Detector	FID (Detector de Ionización de Llama)
Gas Carrier	N ₂
Temperatura de la columna	210 °C
Volumen de inyección	1 mL
Temperatura de inyector	240 °C
Temperatura del detector	300 °C
Procesador de datos	Millenium 2010

2.2.3.3. Determinación del valor de acidez (VA)

Para evaluar el valor de acidez se utilizó el método IUPAC 2.201 (IUPAC, 1992), por el cual se determina los ácidos grasos libres contenidos en

grasas y aceites, animales y vegetales. Se puede expresar como valor de acidez o acidez libre (porcentaje de ácido oleico). El valor de acidez (VA) es el número de mg de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres en 1 g de aceite; mientras que la acidez libre es una expresión convencional del porcentaje de ácidos grasos libres referidos a un ácido graso en particular, para el aceite de canola es utilizado el ácido oleico (peso molecular: 282,47 g/mol).

Aproximadamente 3 gramos de aceite se disolvieron en 150 mL de una mezcla de etanol y éter dietílico 1:1 (v/v), seguido por una titulación de los ácidos grasos libres presentes con una solución de hidróxido de potasio 0,1 N.

El valor de acidez (VA) está dado por la ecuación (2.9):

$$VA = \frac{56,1.N.V}{m} \quad (2.9)$$

Donde:

56,1: Valor establecido por la norma.

V: mL de solución de hidróxido de potasio gastados.

N: normalidad de la solución de hidróxido de potasio.

m: masa en gramos de la muestra.

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.3.4. Determinación del índice de peróxidos (IP)

Para la determinación del índice de peróxidos se utilizó el método IUPAC 2.0501 (IUPAC, 1992) y AOCS Cd 8 (Firestone, 1998).

Este método determina todas las sustancias que oxidan el ioduro de potasio en las condiciones del test, en términos de mili equivalentes de

peróxidos contenidos en un kg de muestra ensayada. Se determinan los peróxidos u otros productos similares de oxidación del aceite. La técnica consiste en una titulación yodométrica y se basa en la capacidad oxidante de los peróxidos para liberar yodo del yoduro potásico.

Se disolvieron 3 g de aceite en 300 mL de una solución de ácido acético glacial:cloroformo 3:2 (v/v). Posteriormente se añadieron 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio. Se preservó de la luz durante un minuto para que tenga lugar la reacción. El yodo liberado se tituló con tiosulfato de potasio estandarizado 0,1 N, utilizando como indicador una solución de almidón al 0,5%. Los resultados se expresan como mili equivalentes de oxígeno por kilogramo de aceite.

El valor del índice de peróxidos se calculó con la ecuación (2.10):

$$IP = \frac{(S-B).N.10^3}{w} \quad (2.10)$$

Donde:

IP: índice de peróxidos expresados como mili equivalentes de oxígeno/kg de muestra.

B: titulación del blanco, mL.

S: titulación de la muestra, mL.

N: normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

w: masa de la muestra, expresada en gramos.

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.3.5. Determinación del valor de p-anisidina (pAV)

El valor de p-anisidina (pAV) es un indicador de los productos secundarios de oxidación, derivados de la descomposición de peróxidos e hidroperóxidos.

Se siguió el procedimiento descrito por la norma Cd 18-90 AOCS (Firestone, 1998), se disolvieron 3 g de aceite con iso-octano en un matraz de 25 mL. Se midió la absorbancia de la solución (Ab) a una radiación con λ de 350 nm con un Espectrofotómetro UV-7804C Ultraviolet-Visible-Spectrophotometer (China), usando como referencia una cubeta con solvente como blanco. Posteriormente se tomó una alícuota de 5 mL de la solución del aceite en un tubo de ensayo y 5 mL de iso-octano en otro tubo de ensayo, se adicionó 1 mL de p-anisidina (previamente preparada 0,25 g de p-anisidina en 100 mL de ácido acético glacial) a cada tubo y se agitó. Transcurridos 10 minutos se midió la absorbancia de la solución (As) en el primer tubo de ensayo, utilizando la solución del segundo tubo como blanco en la cubeta de referencia.

La p-anisidina reacciona con los aldehídos produciendo un color amarillento, y el valor de p-anisidina (pAV) se obtuvo a partir de la ecuación 2.11:

$$pAV = \frac{25 \cdot (1,2 \cdot As - Ab)}{m} \quad (2.11)$$

Donde:

As: absorbancia de la solución después de la reacción con el reactivo de p-anisidina.

Ab: absorbancia de la solución de aceite previo a la reacción con p-ansidina.

m: masa de la muestra expresada en gramos.

2.2.3.6. Cálculo del valor de Totox

El valor de *Totox* mide los productos totales de oxidación teniendo en cuenta los valores de *IP* y *pAV*, según la ecuación (2.12).

$$Totox = 2.IP + pAv \quad (2.12)$$

Donde:

Totox: valor de productos totales de oxidación.

IP: índice de peróxidos.

pAV: Índice de p-anisidina.

2.2.3.7. Análisis estadístico

Con el fin de detectar efectos del pretratamiento con microondas en el aceite extraído, los datos obtenidos a partir de la caracterización de los aceites fueron analizados aplicando el análisis de la variancia (ANOVA) de una sola vía, se consideraron diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Se utilizó el software Infostat (Di Rienzo y col., 2012).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Caracterización de los granos de canola

Los análisis aplicados para determinar la composición proximal, también conocido como análisis proximales Weende, nos permiten caracterizar la

materia prima utilizada en este estudio. Éstos indican la humedad, el contenido de proteína, fibra cruda, fracción lipídica, ceniza y extracto libre de nitrógeno en la muestra.

La composición proximal del grano de canola se muestra en la **Tabla 2-9**. Todos los resultados se expresaron en porcentaje en base seca (%bs).

Tabla 2-9. Composición proximal de los granos de canola en base seca.

Componente	Contenido (%bs)
Humedad	8,5±0,1
Aceite	46,3±0,3
Proteína	20,3±0,1
Fibra Cruda	5,0±0,1
Cenizas	3,5±0,1
ELN	24,9±0,8

La muestra de granos de canola presentó un contenido de aceite dentro del rango reportado por la bibliografía para esta especie (33-55%, Windauer y Ploschuk, 2006) y similar a los registrados por autores que estudiaron la cinética de extracción de aceite de canola a partir de distintas variedades. Fernández y col. (2012) informaron un contenido de aceite de 45,2±0,9%bs en granos de canola de variedad invernal Barrel, mientras que Zárate y col. (2015) reportaron un contenido de aceite de 40,6±0,6% bs en granos de canola variedad primaveral.

El contenido de proteína obtenido experimentalmente (aproximadamente 20%bs) fue superior al informado por Fernández y col. (2012) (18,7%bs) mientras que el contenido de fibra cruda (5,0%bs) fue menor al observado por Thakor y col. (1999) (9,5%bs). A su vez, el contenido de cenizas fue similar al informado por Fernández y col. (2012) para granos

de canola variedad Barrel (3,7%bs) y el ELN obtenido correspondiente al 46,3%bs de la harina resultó mayor al reportado por Cruz-Suarez y col. (2001) para harina de canola comercial (35% bs).

2.3.2. Humedad final de la muestra pretratada con microondas

La humedad final de la muestra pretratada con microondas determinada siguiendo la técnica descrita en la sección 2.2.1.1. fué de $1,8 \pm 0,1\%$ bs; indicando una evaporación de agua por efecto del microondas.

2.3.3. Análisis de los aceites obtenidos

Una forma de caracterizar el aceite es determinar su composición de compuestos mayoritarios y parámetros que permitan describir la calidad del aceite obtenido. La irradiación de los granos con microondas provoca un aumento de temperatura por el movimiento de sus moléculas lo que podría favorecer la oxidación de compuestos presentes en el aceite. El aceite de canola posee una elevada concentración de ácidos grasos insaturados susceptibles de oxidación, al igual que compuestos minoritarios de alto valor nutricional como los tocoferoles (Vitamina E). Por otro lado se ha detectado que la aplicación de tratamientos térmicos sobre el grano favorece la generación del canolol.

Dadas estas consideraciones, es necesario determinar dichos parámetros en los aceites obtenidos y evaluar el efecto del pretratamiento con microondas sobre la calidad del aceite.

2.3.3.1. Contenido de tocoferoles y canolol

El contenido de tocoferoles y canolol del aceite obtenido de granos pretratados y sin pretratar se muestra en la **Tabla 2-10**.

Tabla 2-10. Contenido de tocoferoles y canolol de los aceites de canola obtenidos de granos con y sin pretratamiento con microondas.

Sustancia ($\mu\text{g/g}$ aceite)	Sin pretratar	Microondas
α-TC	330,1 ^a ±3,8	327,9 ^a ±5,4
β-TC	33,2 ^a ±0,9	42,7 ^b ±0,9
γ-TC	580,3 ^a ±5,5	563,1 ^a ±4,9
δ-TC	9,0 ^a ±1,1	31,7 ^b ±3,0
CTT	952,6 ^a ±9,1	965,4 ^a ±14,9
canolol	27,2 ^a ±1,1	167,9 ^b ±6,2

CTT, tocoferoles totales; α -TC, α -tocoferol; β -TC, β -tocoferol; γ -TC, γ -tocoferol, δ -TC, δ -tocoferol. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

A su vez en la **Figura 2-7** se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra pretratada con microondas.

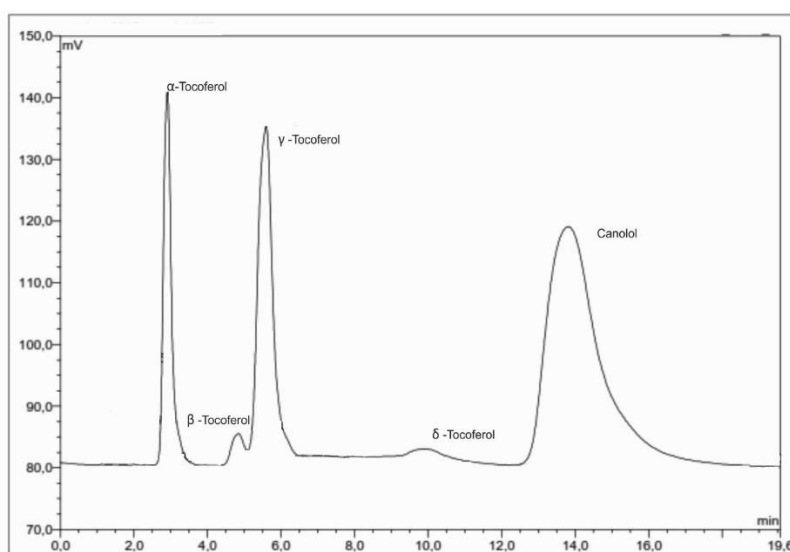


Figura 2-7. Cromatograma UHPLC del aceite de canola correspondiente a la muestra pretratada con microondas.

No se detectó efecto significativo del microondas sobre el contenido total de tocoferoles, siendo superior al rango establecido por el Codex Alimentarium (2015) para aceite crudo de colza de bajo contenido en ácido erúico (240-670 mg/kg aceite. Codex Alimentarius, 2015), mientras que se observaron aumentos significativos en el contenido de los isómeros β -tocoferol y δ -tocoferol; lo cual podría indicar una mayor extracción de estos isómeros por efecto del microondas. A su vez, el contenido de canolol en el aceite aumentó 517% debido al pretratamiento aplicado. El canolol se forma por decarboxilación del ácido sinápico durante el calentamiento de los granos de canola (Koski y col., 2003; Wakamatsu y col., 2005; Spielmeier y col., 2009), la exposición de los granos de canola a la radiación de microondas permitió incrementar significativamente el contenido de este compuesto en el aceite. La generación de este compuesto (586 $\mu\text{g/g}$) en granos de colza por efecto de las microondas también fue reportado por Spielmeier y col. (2009) al irradiar las muestras durante 6 minutos a 70% de potencia en un microondas domestico (800 W).

2.3.3.2. Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos del aceite obtenido de granos pretratados y sin pretratar se muestra en la **Tabla 2-11**, a su vez en la **Figura 2-8** se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra sin pretratamiento con microondas.

Tabla 2-11. Composición de ácidos grasos de los aceites de canola obtenidos de granos con y sin pretratamiento con microondas.

Acido graso (% del total de ácidos grasos)	Sin pretratar	Microondas
C16:0	4,3 ^a ±0,4	4,4 ^a ±0,4
C18:0	1,8 ^a ±0,1	1,8 ^a ±0,1
C18:1	62,3 ^a ±5,7	62,6 ^a ±5,7
C18:2	18,9 ^a ±0,4	18,7 ^a ±0,4
C18:3	8,0 ^a ±0,6	8,0 ^a ±0,6

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$). C16:0, ácido palmítico; C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oleico; C18:2, ácido linoleico; C18:3, ácido linolénico.

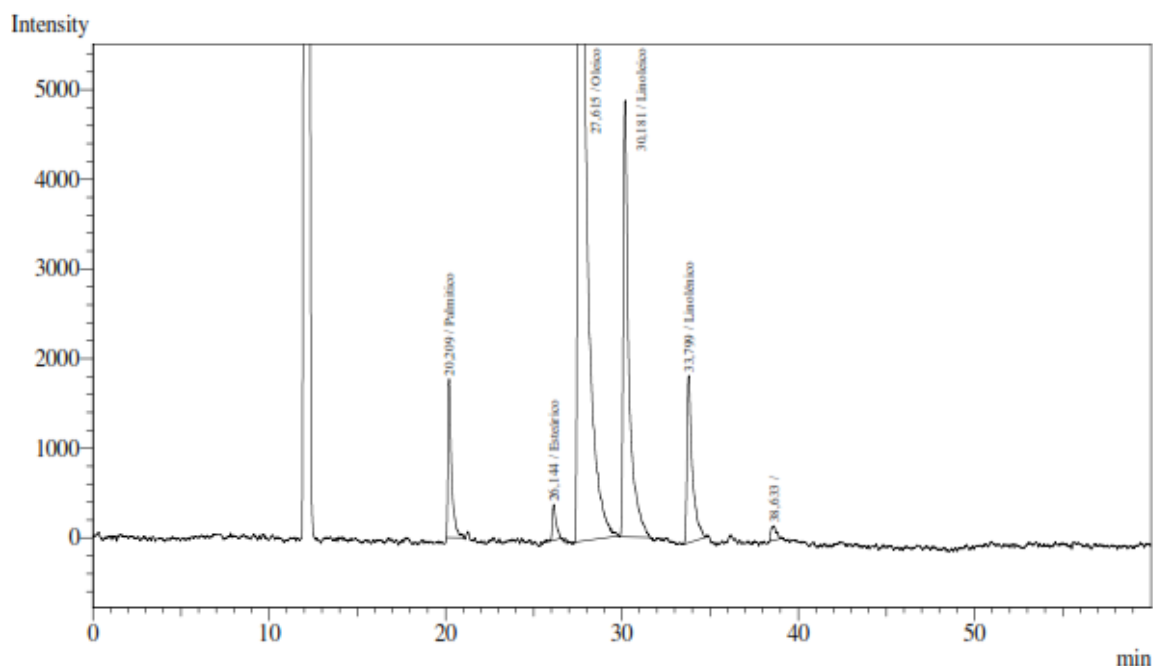


Figura 2-8. Cromatograma de ácidos grasos del aceite de canola

No se detectaron diferencias significativas en la composición de ácidos grasos entre las muestras pretratadas con microondas y sin pretratar, indicando que el pretratamiento con microondas no afecta significativamente la composición de ácidos grasos. Los resultados son acordes a los reportados por Ramos y col. (2017) quienes compararon la

composición de ácidos grasos de aceite de canola obtenido a partir de granos pretratados con microondas y sin pretratar en las mismas condiciones utilizadas en esta tesis.

2.3.3.3. Valor de acidez (VA) e índice de peróxidos (IP)

Existen análisis que ponen en evidencia el trato que han sufrido los aceites, ya sea en su manipulación, procesamiento y almacenaje. Dos de los índices de calidad empleados usualmente son el valor de acidez y el índice de peróxidos.

En la **Tabla 2-12** se presentan índices de calidad de los aceites obtenidos.

Tabla 2-12. Valor de acidez (VA), índice de peróxidos (IP), valor de p-anisidina (pAV) y valor Totox (Totox) de los aceites de canola obtenidos de granos con y sin pretratamiento con microondas.

Índices de calidad	Sin pretratar	Microondas
VA (mgKOH/g)	1,81 ^a ±0,21	1,45 ^a ± 0,22
IP (meq O ₂ /kg)	3,3 ^b ±0,8	0,5 ^a ±0,1
pAV	1,8 ^a ±0,1	3,1 ^b ±0,1
Totox	8,5 ^b ±1,7	4,2 ^a ±0,1

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

No se detectaron diferencias significativas entre las muestras (pretratadas y sin pretratamiento) para el valor de acidez. Se observaron índices de peróxidos (IP) significativamente menores en la muestra pretratada con respecto a la sin pretratar. Sin embargo, los valores de pAV siguieron un comportamiento inverso, mientras que el valor Totox fue significativamente inferior para la muestra pretrada con microondas. El sometimiento de los granos a la radiación con microondas puede

favorecer las reacciones de oxidación (Tan y col., 2001). Uquiche y col. (2008) detectaron un aumento de los valores de índice de peróxido y acidez libre en aceite de avellana chilena obtenido de granos pretratados con microondas durante 4 minutos, mientras que Imran y col. (2016) registraron un aumento en el valor de acidez del aceite de chía extraído de granos pretratados con microondas durante 2,5 minutos. Sin embargo, el contenido de canolol descrito como un potente y efectivo antioxidante en la literatura (Koski y col., 2003; Kuwahara y col., 2004; Wakamatsu y col., 2005; Vuorela y col., 2005) presente en el aceite de canola correspondiente a la muestra pretratada podría tener un efecto antioxidante protector del aceite, lo que podría explicar el comportamiento observado.

Estos resultados son consistentes con los reportados por Ramos y col. (2017), quienes no detectaron diferencias significativas en el índice de acidez por efecto de un pretratamiento con microondas en las mismas condiciones realizadas en este estudio.

Cabe destacar que los valores de acidez e índice de peróxidos fueron inferiores al límite permitido para aceites refinados (0,6 mg de KOH/g de aceite y 10 meq O₂/kg aceite, respectivamente, Codex Alimentarius, 2015).

2.4. CONCLUSIONES PARCIALES

La aplicación de un pretratamiento con microondas sobre granos de canola permitió incrementar el contenido de canolol en un 517%,

mientras que no se detectaron diferencias significativas en el contenido total de tocoferoles entre las muestras pretratadas y sin pretratar. A su vez, el pretratamiento no afectó significativamente la composición de ácidos grasos ni el valor de acidez, mientras que se detectaron diferencias en el índice de peróxidos, el contenido de p-anisidina y el valor de Totox; siendo éste último superior para la muestras sin pretratar, manteniéndose en todos los casos dentro de los límites establecidos por normativa.

Los resultados obtenidos indican la potencialidad de la aplicación de microondas como pretratamiento a la extracción de aceite de canola, no detectándose un deterioro en los índices de calidad del aceite, manteniendo la concentración de tocoferoles e incrementando el contenido de canolol, permitiendo obtener un aceite de mayor calidad dadas las propiedades antioxidantes y bioactivas de estos compuestos.

CAPÍTULO 3

MODELADO DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN CON HEXANO DE ACEITE DE CANOLA**3.1. INTRODUCCIÓN**

La aplicación de tratamientos previos a la extracción busca como objetivo facilitar la liberación del aceite contenido dentro de los granos, disminuyendo el tiempo de procesamiento. Zárate y col. (2015) estudiaron la influencia de un pretratamiento hidrotérmico en los rendimientos de extracción de aceite de canola, reportando un aumento en la cinética de extracción. A su vez, en trabajos previos se logró incrementar el rendimiento de aceite de canola extraído mediante solvente (n-hexano) por la aplicación de pretratamientos con microondas (hasta un 5,4%, Ramos y col. 2017), sin embargo no ha sido desarrollado un estudio de la cinética de extracción de aceite de canola de granos irradiados con microondas.

El proceso de extracción de aceite se ve afectado por muchas variables físicas y químicas, difíciles de evaluar cuantitativa y cualitativamente, por ello se han propuesto diferentes modelos para analizar la cinética de extracción de aceites vegetales (Zárate y col., 2015). En la **Tabla 3-1** se muestran los diferentes modelos utilizados por diversos autores.

Tabla 3-1. Distintos modelos matemáticos utilizados para describir la cinética de extracción de aceites vegetales.

Modelos	Características	Referencias
$E = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} 10^{\left[-(2n+1)\frac{\pi Dt}{4e^2}\right]}$	Láminas finas y homogéneas	Boucher y col. (1942)
$\frac{dE}{dt} = -\frac{12D}{\varepsilon e^2} (C_s - C_0)$	Láminas	Karnofsky (1986)
$\frac{dC_{aceite}}{dt} = \frac{C_{eq} - C_{aceite}}{\left[\frac{A}{k_E} + \frac{B}{D_E} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{R}\right)\right]}$	Etanol, Partículas esféricas	Chien y col. (1990)
$C_L = A_L [1 - e^{(-B_L t)}]$ $C_D = A_D [1 - e^{(-B_D t)}]$	Girasol descascarado	Patricelli y col. (1979)
$\frac{M_t}{M_{\infty}} = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_{\infty}}\right) \frac{6}{\pi^2} e^{[-B(t-t_0)]}$	Partículas esféricas	Pérez y col. (2011)

E: fracción no extraída respecto del total de aceite. D: coeficiente de difusión. e: espesor de la lámina. t: tiempo. ε : fracción de huecos en las láminas. C_s : concentración promedio de aceite en las láminas a tiempo t. C_0 : concentración de la micela usada en la experiencia. C_{aceite} : concentración de aceite en la fase envolvente. C_{eq} : concentración de aceite en las condiciones de equilibrio. r: radio de la zona sin extraer. R: radio de la partícula. k_E : coeficiente de transferencia convectiva. D_E : coeficiente de transferencia difusiva. C_L : concentración de aceite para la etapa de lavado. C_D : concentración de aceite para la etapa difusiva. M_t : masa de aceite que difunde en el tiempo t. M_{∞} : masa de aceite que difunde en el tiempo infinito. M_0 : masa de aceite obtenida en la etapa de lavado. t_0 : tiempo de la etapa de lavado.

Modelo de difusión de Fick modificado

El modelo más extensamente utilizado para modelar la cinética de extracción de aceite de oleaginosas es el Modelo de Difusión de Fick modificado desarrollado por Pérez y col. (2011), que considera dos mecanismos principales: un proceso de lavado del aceite de la superficie de las partículas y un proceso de difusión que puede llevarse a cabo en una o dos etapas, dependiendo de la proporción de células rotas o intactas resultantes del pretratamiento aplicado (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015). Este modelo ha sido utilizado en el análisis de la cinética de extracción de aceite de canola sin

pretratamiento (Fernández y col., 2012) y con pretratamiento hidrotérmico (Zárate y col., 2015), en ambos casos el modelo resultó adecuado observándose una influencia del pretratamiento hidrotérmico sobre los parámetros cinéticos.

El modelo considera estado no estacionario y partículas de geometría esférica, suspendidas en un medio de concentración constante.

La solución de la ley de Fick está dada por la ecuación (3.1) (Crank, 1979):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{n^2 \pi^2} e^{-n^2 B t} \quad (3.1)$$

Siendo:

t: tiempo de difusión en segundos.

M_t : masa de aceite que difunde en el tiempo t.

M_∞ : masa de aceite que difunde en el tiempo infinito.

B: coeficiente del modelo.

Cuando la muestra molida es calentada hasta la temperatura requerida, el aceite se mueve hacia la superficie exterior de la partícula, quedando más accesible para el solvente. Cuando es mezclada con el solvente libre de aceite, se lleva a cabo una serie de fenómenos, como el lavado del aceite superficial, la saturación con solvente que causa una modificación de la estructura y el desplazamiento de una fracción de micela por mecanismos no difusivos. Estos fenómenos son llevados a cabo durante periodos de tiempo mucho más cortos que los mecanismos de difusión molecular (Pérez y col., 2011). De esta manera, se considera que acontecen instantáneamente, removiendo una fracción de aceite durante un período inicial. Las condiciones de contorno se presentan por (3.2-3.5):

$$\mathbf{t} = \mathbf{0} \quad \mathbf{M} = \mathbf{0} \quad (3.2)$$

$$\mathbf{t} = \mathbf{t}_0 \quad \mathbf{M} = \mathbf{M}_0 \quad (3.3)$$

$$\mathbf{t} = \mathbf{t} \quad \mathbf{M} = \mathbf{M}_t \quad (3.4)$$

$$\mathbf{t} \rightarrow \infty \quad \mathbf{M} = \mathbf{M}_\infty \quad (3.5)$$

Bajo estas condiciones, el modelo difusivo modificado que considera este periodo inicial está dado por la ecuación (3.6)

$$\frac{M_t - M_0}{M_\infty - M_0} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{n^2 \pi^2} e^{-n^2 B(t-t_0)} \quad (3.6)$$

Reescribiendo la ecuación (3.6) se obtiene (3.7)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{n^2 \pi^2} e^{-n^2 B(t-t_0)} \quad (3.7)$$

Donde B se describe según ecuación (3.8):

$$B = \frac{D_{\text{eff}} \pi^2}{R_m^2} \quad (3.8)$$

Siendo:

D_{eff} : difusividad efectiva (m^2/s)

R_m : radio medio de partícula (m).

A su vez para tiempos suficientemente grandes, como aproximación, es válido considerar sólo el primer término de la serie (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015) de modo que la ecuación (3.7) puede expresarse como (3.9):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - A e^{(-Bt)} \quad (3.9)$$

Donde:

$$A = \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \frac{6}{\pi^2} e^{Bt_0} \quad (3.10)$$

Redes neuronales artificiales

Las redes neuronales artificiales (RNA) son técnicas de modelado con elevada potencia inspiradas en la forma en la que las neuronas biológicas desarrollan las funciones de aprendizaje y memoria. Las RNA presentan varias ventajas sobre las técnicas de modelado convencionales ya que son capaces de modelar sin necesidad de suposiciones sobre la naturaleza de los mecanismos fenomenológicos, y son capaces de aprender relaciones lineales y no lineales entre las variables a partir de un conjunto de ejemplos (Fathi y col., 2011). Las unidades fundamentales de las RNA son las neuronas (análogas a las neuronas biológicas) y los pesos, conexiones ponderadas comparables a las sinapsis en un sistema biológico. Mediante cálculos simultáneos en paralelo de sus elementos, una RNA es capaz de aprender a partir de ejemplos y generalizar permitiendo abordar distintos problemas, aún cuando los datos sean incompletos o contengan errores (Rafiq y col., 2001). Varios autores recomiendan la utilización de esta herramienta para modelar cinéticas de transferencia de masa (Baruch y col., 2004; Lertworasirikul y Saetan, 2010; Shokri y col., 2011). En particular, se han realizado estudios utilizando RNA como una herramienta de modelado para predecir la cinética de extracción de aceite esencial de anís, encontrando que el modelo desarrollado resultó más preciso en comparación con un modelo matemático de difusión (Shokri y col., 2011).

Perceptrón “feedforward” multicapa

La estructura perceptrón multicapa es una de las más comunes (Rafiq y col., 2001; Fathi y col., 2011; Shokri y col., 2011 Ramzi y col., 2015), consta de una o más entradas que representan las variables independientes, una capa de salida con neuronas que representan las variables dependientes y una o más capas ocultas (Hagan y col., 1996) que contiene neuronas para ayudar a capturar la no linealidad en el sistema. La complejidad de la red depende del número de capas y el número de neuronas en cada capa. Las capas ocultas correlacionan las entradas x con las salidas y , a través de una serie de parámetros denominados pesos w y umbrales b interconectados matemáticamente según ecuación (3.11) (Shokri y col., 2011):

$$y_i = f(\sum_{j=1}^n w_{ij}v_j + b_i) \quad (3.11)$$

Donde w_{ij} es el peso de la j -ésimo componente del vector de entrada que es conectado a la i -ésima neurona; n es el número de entradas a la neurona; b_i es el umbral asociado con la neurona i -ésima, que añade una variable extra, lo que puede mejorar la potencia con respecto a una red sin umbrales (Hagan y col., 1996) y f es la función de activación que le confiere el comportamiento no lineal a la neurona. La función de activación puede ser lineal o no lineal dependiendo de la topología de la red.

Objetivos

En el presente capítulo se analizarán los objetivos específicos presentados en el Capítulo 1, a saber:

- Estudiar la cinética de extracción del aceite por solvente (n-hexano) de los granos de canola pretratados mediante microondas y desarrollar un modelo que explique el fenómeno.
- Comparar los resultados obtenidos de los estudios de la cinética de extracción del aceite de granos de canola pretratados con microondas con la cinética de extracción obtenida en granos sin pretratar y de canola pretratada hidrotérmicamente (realizado en trabajos previos) y desarrollar un modelo único para las distintas condiciones.

En primer lugar se presenta la evolución del efecto del pretratamiento con microondas en la cinética de la extracción con solvente (n-hexano) de aceite de canola y se desarrollan modelos adecuados para predecir y/o explicar los diversos fenómenos que intervienen en este proceso. Además, se desarrolla un modelo de ajuste bidimensional en función del tiempo y la temperatura a partir del modelo de difusión de Fick modificado, permitiendo obtener los parámetros característicos con elevados coeficientes de correlación. Posteriormente, se modela la cinética de extracción a partir de una herramienta de inteligencia artificial. Para ello se desarrolla una estructura de Red Neuronal Artificial (RNA) para modelar y predecir la cinética de extracción con solvente (n-hexano) de aceite de canola a distintas temperaturas para 3 muestras de granos y 3 condiciones (sin pretratar, pretratamiento hidrotérmico, pretratamiento con microondas) a partir de datos experimentales y extraídos de bibliografía.

3.2. PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS: MODELADO DE LA CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

3.2.1. Materiales y Métodos

3.2.1.1. Tratamiento antes de la extracción

Se utilizaron granos de canola acondicionados a una humedad de 5,7%bs como se especificó en la sección 2.2.2.2. Las muestras se dividieron en dos partes, una de las cuales se irradió con microondas (pretratamiento) según se indicó en la sección 2.2.2.2. Luego las muestras tratadas y sin tratar se molieron en un molinillo de café Moulinex (Argentina) y se tamizaron para obtener un tamaño de partícula en el intervalo de 0,42-1,00 mm para las diferentes pruebas, de acuerdo a la técnica reportada por distintos autores (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015). En los períodos en los cuales las muestras no se utilizaron, ambas se almacenaron en recipientes herméticos en atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 4 °C. Previo a su utilización se deja alcanzar la temperatura ambiente.

3.2.1.2. Determinación del tamaño de partícula

Con el fin de determinar un diámetro medio de partículas (D_m) representativo se realizó una distribución de partículas de cada muestra (con pretratamiento y sin pretratar) por triplicado, utilizando el Software ImageJ 1.501 (2016), como describen Igathinathane y col. (2008) y Baümler y col. (2014). El software identifica y cuantifica las partículas a partir de una imagen, indicando parámetros como cantidad de partículas, superficie y esfericidad. Considerando que las partículas molidas pueden asemejarse a

esferas (Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015) y a partir de la ecuación (3.12), se logra estimar el diámetro de cada partícula.

$$D_p = \sqrt{\frac{4 \times S \times \varnothing}{\pi}} \quad (3.12)$$

Donde:

D_p : diámetro de partícula.

S : superficie de la partícula.

\varnothing : esfericidad.

3.2.1.3. Ensayos cinéticos

El proceso de extracción de aceite (sólido-líquido) se realizó en un dispositivo batch con un agitador magnético (200 rpm) utilizando muestras sin pretratar y sometidas a pretratamiento con microondas como se indicó en la sección 3.2.1.1. Con el fin de determinar la cinética de extracción de aceite, los experimentos se llevaron a cabo a distintos tiempos (de 300 a 64800 s) y a diferentes temperaturas: 298 (25 °C), 313 (40 °C), 323 (50°C) y 333 K (60 °C). 5 g de muestra molida y 85 mL de n-hexano de grado técnico (BIOPACK, ≥98,5%) se calentaron por separado a temperatura de extracción antes de cada ensayo durante 5 minutos. Luego se pusieron en contacto mediante la adición del disolvente al recipiente con la muestra (Relación sólido:solvente 1:17, Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015). Transcurrido cada tiempo preestablecido, la micela se separó de la harina por centrifugación en un equipo Thermo SCIENTIFIC, SORVALL LEGEND X1 (Alemania) durante 5 minutos a 14069 G. Posteriormente se filtró el sobrenadante, la micela se recogió en un balón y el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio R-3000 Büchi (Suiza). Para eliminar el

resto de n-hexano, los balones se colocaron en estufa de aire forzado (Drying oven DHG-9123, China) a 105°C durante una hora. La cantidad de aceite obtenido se determinó gravimétricamente, y el rendimiento de aceite en base seca fue calculado según la ecuación (3.13).

$$Rend = \frac{p_{ac}}{m} \cdot (1 + H) \cdot 100 \quad (3.13)$$

Donde:

Rend: rendimiento de aceite en% base seca.

p_{ac}: masa de aceite obtenido luego de la extracción.

m: masa de la muestra previo a la extracción.

H: humedad de la muestra en base seca.

Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2.1.4. Modelo de difusión de Fick modificado

Para modelar la cinética de extracción de aceite a partir de granos molidos de canola se utilizó un modelo difusivo modificado de la ley de Fick, considerando estado no estacionario y partículas de geometría esférica, suspendidas en un medio de concentración constante (Crank, 1979), incluyendo una etapa de lavado el cual ocurre en el tiempo t_0 el cual puede despreciarse por considerarse cercano a cero (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015). El modelo descrito en la Sección 3.1., despreciando el tiempo de lavado t_0 , se presenta en la ecuación (3.14).

$$\frac{M_t}{M_\infty}(t) = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6}{n^2 \pi^2} e^{-n^2 B t} \quad (3.14)$$

Donde:

$\frac{M_0}{M_\infty}$: cantidad de aceite obtenida durante la etapa de lavado relativa a la obtenida a tiempo infinito (fracción de lavado).

B : término asociado a la difusividad efectiva (ecuación 3.8).

El rendimiento de aceite obtenido a 64800 s fue identificado por M_∞ (cantidad de soluto que difunde en el tiempo infinito) ya que se consideró un tiempo suficientemente largo para alcanzar el estado de equilibrio (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015).

El ajuste de los modelos se realizó utilizando el paquete estadístico SigmaPlot 12.0 (2011).

3.2.1.5. Análisis estadístico

Para la evaluación de los rendimientos de extracción se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) de una vía en conjunto con el Test de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparar las medias.

Por otro lado, la comparación de los modelos no lineales se llevo a cabo a través del principio de la extra suma de cuadrados (ESC) con el fin de determinar si los coeficientes M_0/M_∞ y/o B en la ecuación (3.14) son dependientes de la temperatura para el rango 298-333 K. Las hipótesis nula (H_0) e hipótesis alternativa (H_1) propuestas se expresan de la siguiente forma:

H_0 : Los coeficientes M_0/M_∞ y/o B no dependen de la temperatura (Modelo Global en el caso de que ninguno sea dependiente de la temperatura; modelo M_0/M_∞ común, sólo B varía con la temperatura, y modelo B común si sólo M_0/M_∞ depende de la temperatura).

H_1 : Ambos parámetros M_0/M_∞ y B dependen de la temperatura (modelo de parámetros individuales).

A su vez se analizó la influencia del pretratamiento con microondas, se compararon los modelos utilizando un estadístico de contraste (F_0) y comparándolo con el correspondiente valor crítico (F_c , 95% de confiabilidad), determinados mediante las ecuaciones (3.15) y (3.16) (Fernández y col., 2012), planteando las hipótesis:

H_0 : El pretratamiento no influye en los parámetros del modelo,

siendo la hipótesis alternativa,

H_1 : El pretratamiento tiene influencia en los parámetros del modelo.

$$F_0 = \frac{\frac{\sum_{i=1}^q (s_i^g - g_i)^2 - \sum_{i=1}^q (s_i^d - g_i)^2}{(q - \tilde{n}) - (q - a)}}{\frac{\sum_{i=1}^q (s_i^d - g_i)^2}{q - a}} \quad (3.15)$$

$$F_c = F[0,05, a - \tilde{n}, q - \tilde{n}] \quad (3.16)$$

Donde:

s_i^g : valores simulados de M_t/M_∞ obtenido con el modelo global.

s_i^d : valores simulados de M_t/M_∞ obtenido con el modelo de parámetros individuales.

g_i : valor promedio de la medida experimental.

q : número total de mediciones.

\tilde{n} : número de parámetros estimados con el modelo global.

q : número de parámetros estimados con el modelo de parámetros individuales.

F: estadístico de la distribución de Snedecor.

3.2.2. Resultados y discusión

3.2.2.1. Tamaño de partícula

Con los datos obtenidos, organizándolos en una tabla de rangos, se construyó un gráfico de distribución de tamaño de partículas comparando las muestras sin pretratar (ST) y pretratadas con microondas (MO) (**Figura 3-1**).

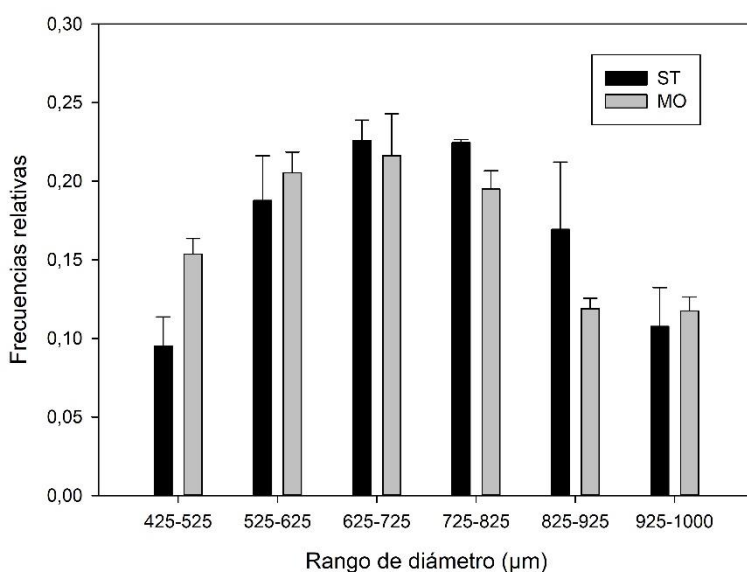


Figura 3-1. Distribución de partículas de las muestras molidas. ST: muestras sin pretratar. MO: muestras pretratadas con microondas.

La **Figura 3-1** muestra una tendencia similar en la distribución de partículas para ambas muestras, presentando la mayor diferencia para los rangos 425-525 y 825-925.

A partir de la ecuación (3.17) y tomando el diámetro medio de cada rango como diámetro nominal (D_i), se puede calcular un D_m de partícula.

$$D_m = \sum_{i=1}^n x_i D_i \quad (3.17)$$

Donde:

D_m : diámetro medio de partícula.

x_i : frecuencia relativa del rango i .

D_i : diámetro nominal del rango i .

Los resultados se muestran en la **Tabla 3-2**.

Tabla 3-2. Diámetros y radios medios de las muestras de canola molida pretratada con microondas y sin pretratar.

Muestra	Diámetro medio D_m (μm)	Radio medio R_m (μm)
ST	731±17	365±8
MO	705±3	352±1

ST: muestra sin pretratar. MO: muestra pretratada con microondas.

3.2.2.2. Cinética de extracción de aceite

Los rendimientos de extracción de aceite en función del tiempo, a distintas temperaturas, para las muestras sin pretratar y pretratadas con microondas se muestran en las **Figuras 3-2 y 3-3**, respectivamente.

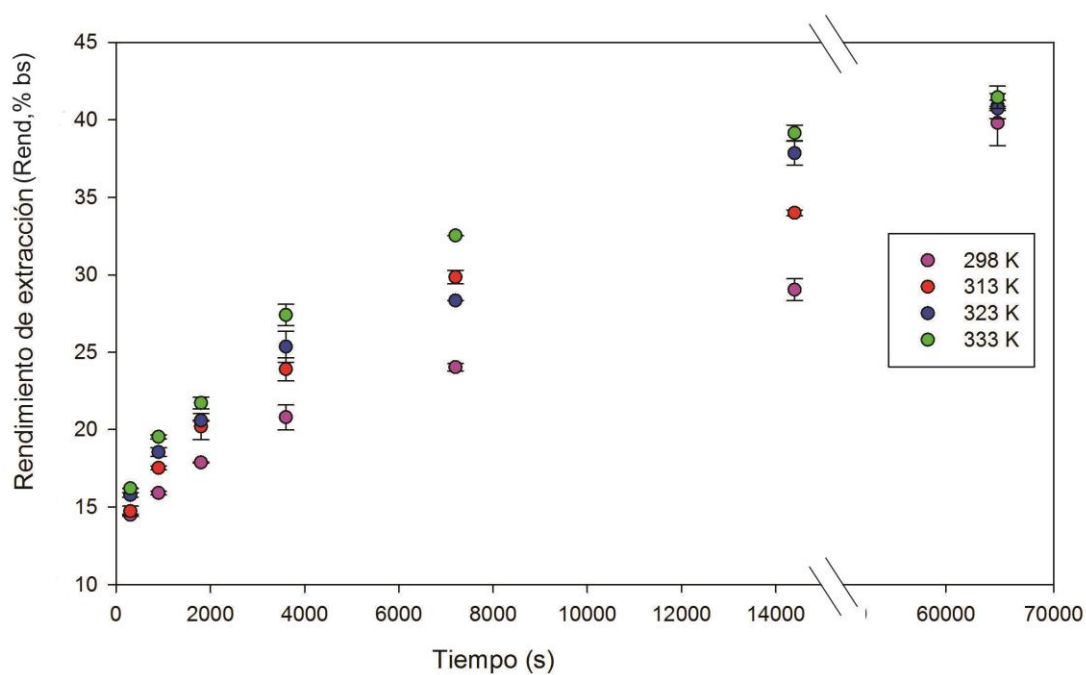


Figura 3-2. Rendimientos de extracción de aceite de canola a distintas temperaturas para la muestra sin pretratar.

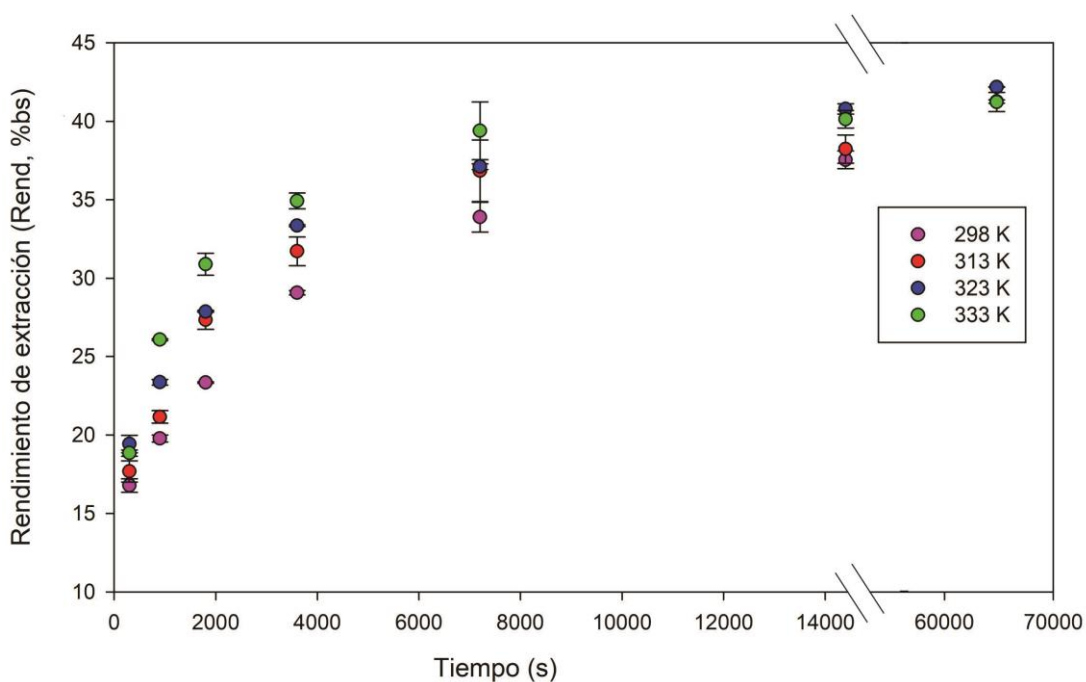


Figura 3-3. Rendimientos de extracción de aceite de canola a distintas temperaturas para la muestra pretratada con microondas.

En general, para cada temperatura y tiempo, se logró un aumento estadísticamente significativo en los rendimientos por efecto del pretratamiento, registrando un incremento máximo del 41% respecto a la muestra sin tratar a 298°C y 7200 segundos. Los resultados fueron similares a los informados por Ramos y col. (2017), quienes registraron aumentos significativos por efecto del microondas de hasta 25,1% relativo a la muestra sin pretratar a 7200 segundos de extracción por Soxhlet, atribuido a una modificación de la estructura celular debido al pretratamiento, lo que causaría una debilitación de las membranas celulares facilitando la accesibilidad al aceite del solvente y/o la ruptura de membranas durante la molienda.

3.2.2.3. Modelo de difusión de Fick modificado

Modelo simplificado

Para tiempos de extracción suficientemente grandes varios autores consideraron válido como aproximación tener en cuenta sólo el primer término de la serie (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012; Zárate y col., 2015), así el modelo descrito por la ecuación 3.14 puede expresarse de manera simplificada como la ecuación (3.18):

$$\frac{M_t}{M_\infty}(t) = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \frac{6}{\pi^2} e^{-Bt} \quad (3.18)$$

Dicho modelo simplificado se aplicó para ajustar los datos experimentales. Los parámetros obtenidos se muestran en la **Tabla 3-3**.

Tabla 3-3. Parámetros para el modelo simplificado del modelo de difusión de Fick modificado.

Muestra	Temperatura (K)	$\frac{M_0}{M_\infty}$	$B \cdot 10^5$ (1/s)	R^2 ajus
Sin pretratar	298	-0,03	6,3	0,994
	313	-0,04	11,9	0,990
	323	-0,02	12,3	0,984
	333	-0,01	16,0	0,993
Microondas	298	-0,01	18,0	0,993
	313	0,01	26,2	0,976
	323	0,07	25,5	0,990
	333	0,03	43,1	0,981

Si bien los ajustes tuvieron altos R^2 ajustados, se observa que la mayoría de los valores de fracciones de lavado (M_0/M_∞) fueron negativos, lo cual carece de sentido físico. Un análisis detallado de la serie exponencial muestra que la validez de la simplificación asumida (tiempos suficientemente largos) varía en función del parámetro B y del tiempo mínimo de extracción experimental; como se muestra en la **Figura 3-4**.

Se observa que a mayor valor de B disminuye el tiempo mínimo (t_{\min}) que puede considerarse suficientemente largo. Dado la dependencia de la simplificación con el parámetro B , el modelo simplificado podría no ser adecuado para describir los fenómenos involucrados.

A su vez dada la condición de contorno del parámetro M_0/M_∞ , el valor de dicho parámetro tiene influencia en la magnitud de la diferencia entre modelos simplificados observada.

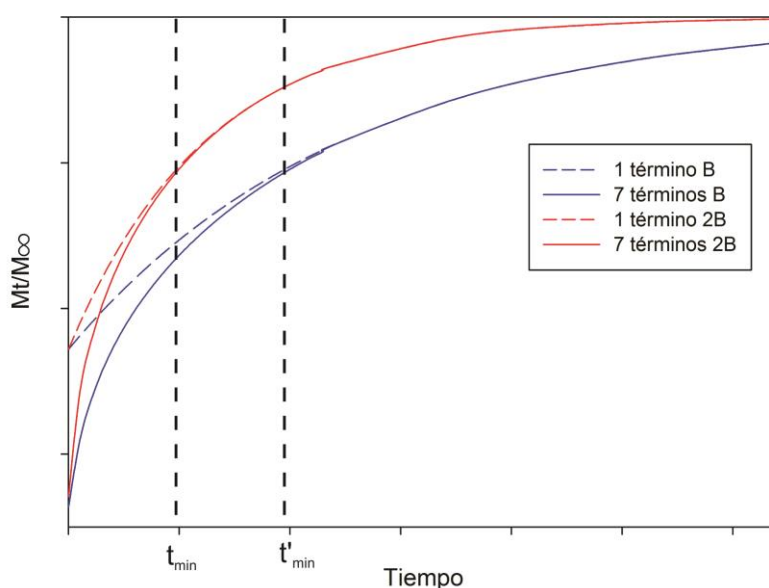


Figura 3-4. Gráfico de la serie exponencial en función de distintos valores de B . Líneas de puntos indican el tiempo a partir del cual la simplificación es válida para cada caso. t_{\min} y t'_{\min} : tiempo a partir del cual es válida la simplificación.

Dado que la solución de la ecuación de Fick obtenida por Crank (1979) involucra una serie de infinitos términos, cualquier modelo con un número finito de términos será una simplificación; si la misma es correcta al aplicar un modelo con mayor cantidad de términos las curvas obtenidas deberían superponerse. A partir de datos experimentales puede aplicarse el modelo simplificado obteniendo elevados coeficientes de correlación, no obstante si la simplificación no es válida, se observará un error en la verificación con un modelo con mas términos para los valores de los parámetros hallados como se observa en la **Figura 3-5**.

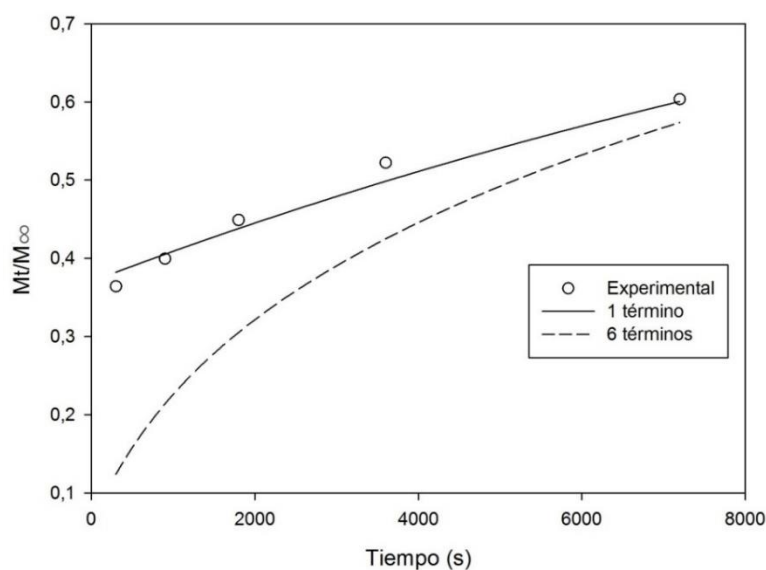


Figura 3-5. Rendimiento relativo de aceite a 298 K para la muestra sin pretratar y ajustes con modelos de 1 y 6 términos tomando $M_0/M_\infty = -0,03$; $B = 6,3 \cdot 10^{-5}$.

Mostrando que los valores de los parámetros hallados con el modelo con 1 término no se corresponden con los óptimos expresados por la solución de Crank (1979) para este sistema. Cabe destacar que la mayor diferencia en las curvas se observa para los menores tiempos, por lo que obteniendo un criterio de selección de términos que disminuya la diferencia para el menor tiempo experimental registrado se asegura un menor error a tiempos mayores.

El error en los valores de los parámetros se propaga en la obtención de coeficientes de difusión (D_{eff}) y fracciones de lavado (M_0/M_∞), y por consiguiente puede conducir a una interpretación de fenómenos errónea

Modelo incluyendo más de un término de la serie

Determinación de términos influyentes de la serie

A partir del análisis realizado se hace necesario contemplar la naturaleza de los datos experimentales representados en sus parámetros óptimos de ajuste para determinar la cantidad de términos de la serie que resultan significativos. En función de lo expresado se desarrolló y programó un algoritmo de cálculo con el software Dev-C++ 5.5.3 (2013) el cual permite determinar la cantidad de términos de la serie necesarios para el ajuste de cada caso particular, a partir de un ajuste inicial y definiendo un tiempo de extracción experimental mínimo siguiendo el procedimiento que se describe en el esquema que se indica en la **Figura 3-6**, siendo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{i=1}^n R_i \quad (3.19)$$

Donde:

$$R_i = \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \frac{6}{i^2 \pi^2} e^{-i^2 B t} \quad (3.20)$$

Se asumió como error aceptable el equivalente al error mínimo experimental reportado en los experimentos (0,001). El programa muestra como salida la cantidad de términos mínimos necesarios para la simplificación del modelo y el error relativo porcentual (RE%, ecuación 3.21) de la predicción con el modelo con 1 término con respecto al modelo con la cantidad de términos necesarios para el tiempo mínimo, permitiendo estimar la magnitud del error para cada sistema de manera sencilla.

$$RE\% = \left| \frac{(\gamma_1 - \gamma)}{\gamma_1} \right| \cdot 100 \quad (3.21)$$

Donde:

RE% es el error relativo porcentual.

y_1 es la respuesta predicha por el modelo utilizando 1 término para el menor tiempo experimental (t_{\min}).

y es la respuesta por el modelo utilizando la cantidad de términos necesarios calculados para el menor tiempo experimental (t_{\min}).

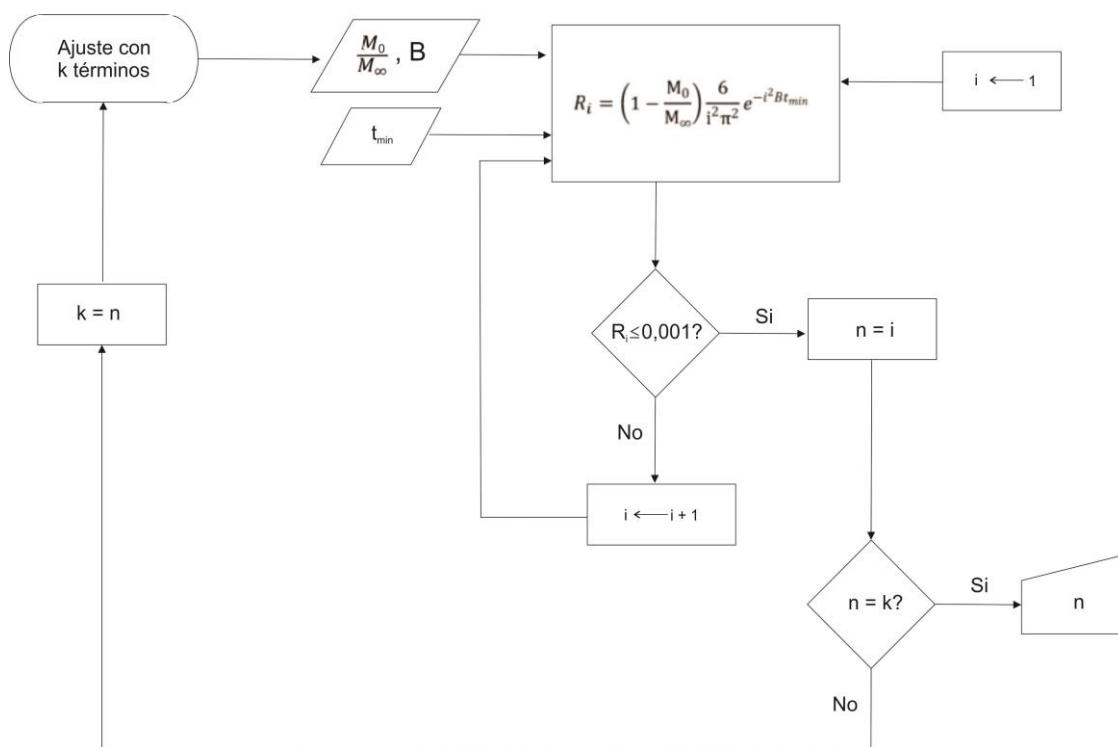


Figura 3-6. Esquema de cálculo para la cantidad de términos necesarios de la serie. k : cantidad de términos ingresados en el ajuste de los datos. M_0/M_∞ : cantidad de aceite relativa al obtenido a tiempo infinito durante la etapa de lavado. B : parámetro del modelo obtenido del ajuste. t_{\min} : menor tiempo de extracción experimental. i : contador. n : cantidad de términos necesarios para realizar el ajuste.

La programación y la imagen de la ventana del programa de cálculo se muestran en la sección **A2** del **Anexo**.

El análisis de los datos experimentales con el algoritmo de cálculo dió como resultado un mínimo de 9 términos de la serie del modelo para el caso con menor velocidad de extracción (sin pretratar, 298 K); por lo que se adoptó dicha cantidad para modelar todos los casos con el fin de estandarizar el

modelo a utilizar¹. Cabe destacar que para el tiempo mínimo de extracción (300 s) el programa indicó que se comete un error relativo porcentual (RE%) de 69,2% utilizando el modelo con 1 término con respecto al modelo con 9 términos.

Modelo seleccionado (9 términos)

En la **Tabla 3-4** se muestran los parámetros obtenidos para cada temperatura y muestra, aplicando el modelo global, parámetros individuales y a parámetros constantes (M_0/M_∞ común y B común).

El análisis del estadístico de contraste F_0 arrojó una dependencia del parámetro B con la temperatura, tanto para la muestra pretratada como sin tratar ($F_0 = 0,70$ y $F_0 = 0,25$, respectivamente, ambos menores que el $F_c = 2,87$), mientras que para M_0/M_∞ no se detectó influencia de la temperatura en la muestra pretratada ni en la muestra sin tratar ($F_0 = 18,14$ y $F_0 = 3,66$; respectivamente, ambos mayores que $F_c = 2,87$). Dado que el Estadístico de contraste para la comparación directa (F_0^{cd} , Fernández y col., 2012) calculado al comparar los datos experimentales con los datos predichos por el modelo M_0/M_∞ común fue de 0,02 para la muestra sin tratamiento y de 0,01 para la muestra pretratada, inferiores al valor crítico correspondiente a un nivel de confianza del 95% (Valor crítico de la distribución F de Snedecor para la comparación directa, $F_c^{cd} = 1,88$), la falta de ajuste no fue

¹ Cabe aclarar que en el trabajo de Sánchez y col. (2017) donde se analizaron los mismos datos experimentales de este Capítulo se adoptó un modelo de ajuste con 8 términos dado que los parámetros permanecían invariantes al adicionar más términos; sin embargo la utilización del algoritmo propuesta en esta sección aporta un criterio independiente del software que se utilice.

significativa, lo que indica que este modelo es adecuado. Por lo tanto, el modelo seleccionado para representar la extracción de aceite de canola fue el modelo M_0/M_∞ común, es decir que dicho parámetro permanece constante con la temperatura.

En las **Figuras 3-7** y **3-8** se muestran las curvas de ajuste con el modelo seleccionado para la extracción de aceite de muestras sin tratar y pretratadas con microondas, respectivamente, para las distintas temperaturas con sus correspondientes ajustes.

Tabla 3-4. Coeficientes de los modelos ajustados para muestras sin pretratar y pretratadas con microondas (Microondas).

		Sin pretratar			Microondas		
Modelo	T(K)	M_0/M_∞	$B \cdot 10^5$ (1/s)	R^2_{ajus}	M_0/M_∞	$B \cdot 10^5$ (1/s)	R^2_{ajus}
Global	298-333	0,25±0,02	7,2±0,8	0,952	0,27±0,03	18,5±2,2	0,945
Parámetros Individuales	298	0,26±0,02	4,0±0,1	0,993	0,26±0,02	12,0±0,8	0,996
	313	0,23±0,01	7,3±0,1	0,997	0,25±0,03	17,5±2,0	0,988
	323	0,24±0,04	9,0±1,5	0,977	0,28±0,01	19,5±1,0	0,997
	333	0,24±0,02	10,5±0,7	0,960	0,23±0,03	34,2±3,0	0,993
M_0/M_∞ común	298	0,25	4,0±0,2	0,993	0,27	11,7±0,5	0,996
	313		7,0±0,3	0,997		16,8±1,2	0,990
	323		8,7±0,8	0,981		19,8±0,7	0,997
	333		10,2±0,3	0,997		31,0±1,7	0,992
B común	298	0,17±0,04	7,2	0,932	0,16±0,04	18,5	0,966
	313	0,24±0,01		0,998	0,24±0,02		0,990
	323	0,27±0,03		0,974	0,29±0,01		0,998
	333	0,31±0,02		0,977	0,38±0,04		0,949

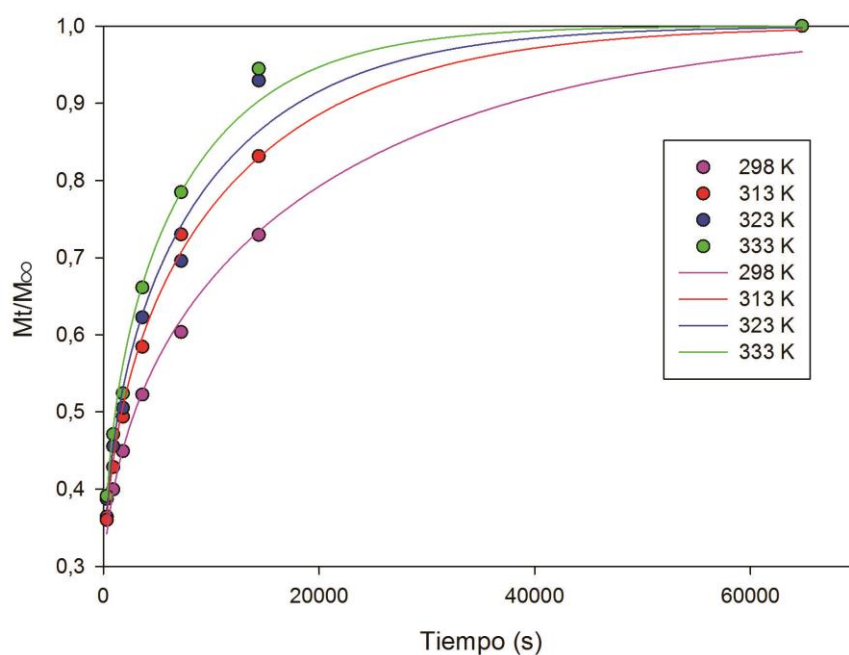


Figura 3-7. Rendimiento relativo de aceite a distintas temperaturas para muestras de canola sin pretratar y curva ajustada según modelo de difusión de Fick modificado con M_0/M_∞ constante con la temperatura.

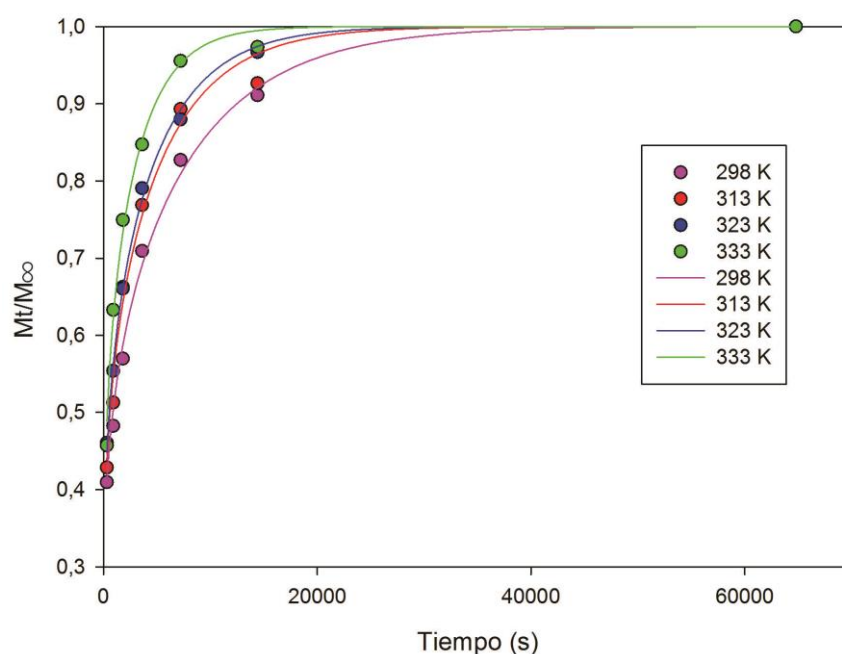


Figura 3-8. Rendimiento relativo de aceite a distintas temperaturas para muestras de canola pretratada con microondas y curva ajustada según modelo de difusión de Fick modificado con M_0/M_∞ constante con la temperatura.

Las fracciones de lavado calculadas por el modelo indican que una significativa cantidad de aceite se extrae durante la etapa de lavado, tanto para la muestra pretratada como sin tratar, los valores fueron similares a las observados por Fernández y col. (2012) en aceite de canola variedad Invernal Barrel obtenido de granos sin pretratar (0,24) y reportados por Zárate y col. (2015) para aceite de canola de granos sin pretratar (0,27).

La fracción de lavado obtenida para la muestra irradiada con microondas resulto ligeramente superior al valor obtenido de la muestra sin tratamiento, registrando un aumento del 8%. Zarate y col. (2015) reportaron un aumento del 100% en el valor de M_0/M_∞ por efecto de un pretratamiento hidrotérmico sobre granos de canola.

Coefficientes de difusión efectiva

A partir de los valores de radio de partícula promedio calculados en la sección 3.2.2.1 (**Tabla 3-2**) se calcularon, utilizando la ecuación (3.8), los coeficientes de difusión efectiva (D_{eff}), tabulados en la **Tabla 3-5**:

Tabla 3-5. Coeficientes de difusión efectiva para las muestras pretratadas y sin pretratar a distintas temperaturas.

$D_{eff} \cdot 10^{13} (m^2/s)$				
Temperatura (K)	298	313	323	333
Sin pretratar	5,4±0,2	9,4±0,4	11,7±1,1	13,7±0,4
Microondas	14,6±0,6	21,1±1,5	24,9±0,8	38,9±2,1

Los valores de D_{eff} obtenidos para la muestra sin tratar fueron menores a los obtenidos por Zárate y col. (2015) ($3,15 \cdot 10^{-12} - 7,44 \cdot 10^{-12} m^2/s$) y a los obtenidos por Fernández y col. (2012) ($1,3 \cdot 10^{-12} - 3,0 \cdot 10^{-12} m^2/s$) para aceite

de canola de granos sin pretratar extraído con n-hexano (ambos trabajos utilizando el modelo de difusión de Fick modificado simplificado a 1 término de la serie) indicando que se presenta una variabilidad del coeficiente dentro de la misma especie. Para todas las temperaturas estudiadas los coeficientes de difusividad correspondientes a la muestra pretratada con microondas fueron superiores en una proporción mayor a 2:1 a los obtenidos para la muestra sin tratar, similar a la tendencia observada por Zárate y col. (2015) para pretratamiento hidrotérmico de granos de canola.

Dependencia con la Temperatura

La dependencia de D_{eff} con la temperatura se describe generalmente por la ecuación de Arrhenius (3.22):

$$D_{eff} = D_0 e^{-\frac{\Delta E}{R_g T}} \quad (3.22)$$

Donde:

D_0 : constante pre exponencial (m^2/s).

ΔE : energía de activación (kJ/mol).

R_g : constante de los gases ($kJ/molK$).

T : temperatura (K).

La solución de la linealización de esta expresión se muestra en (3.23) para la muestra pretratada con microondas y en (3.24) para la muestra sin tratar (gráficamente en la **Figura 3-9**):

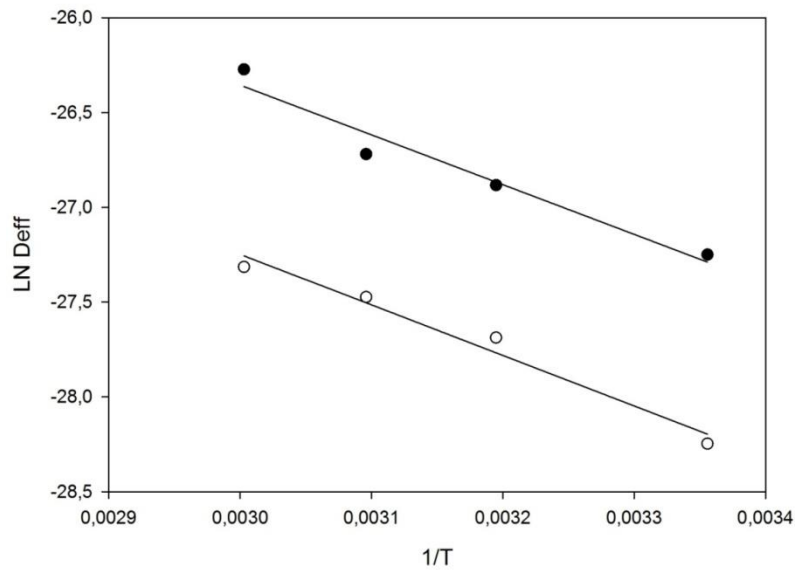


Figura 3-9. Linealización de la Ecuación de Arrhenius. (●) Pretratadas con microondas. (○) Sin pretratar. LN Deff: logaritmo natural del coeficiente de difusión efectiva. T: temperatura (K)

$$\ln(Deff) = -18,5(\pm 1,3) - \frac{2623(\pm 407)}{T} \quad R^2_{ajus} = 0,931 \quad p = 0,0232 \quad (3.23)$$

$$\ln(Deff) = -19,2(\pm 1,0) - \frac{2665(\pm 312)}{T} \quad R^2_{ajus} = 0,960 \quad p = 0,0134 \quad (3.24)$$

Los valores R^2_{ajus} y p correspondientes indican que la ecuación de Arrhenius describe adecuadamente la dependencia de D_{eff} con la temperatura. A su vez, los parámetros obtenidos para la muestra irradiada con microondas fueron $D_0 = 9,4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ y $\Delta E = 21,8 \text{ kJ/mol}$; duplicándose el valor de D_0 con respecto a la muestra sin tratar, mientras que los valores de ΔE fueron similares. La acción de las microondas afecta la micro estructura de los granos, aumentando la porosidad de la muestra (Uquiche y col., 2008), comportamiento que observaron Ramos y col. (2017) en muestras de canola pretratadas con microondas a partir de micrografías electrónicas de barrido. Los valores de D_0 obtenidos son consistentes con

esta acción, dado que el mismo es dependiente de dicha porosidad (Fillion y col., 2002).

3.2.2.4. Modelo de difusión de Fick modificado bidimensional² (dependiente de la temperatura y el tiempo)

Teniendo en cuenta la ecuación de Arrhenius (3.22) y combinando las ecuaciones (3.8), (3.14) se obtiene la ecuación (3.25):

$$\frac{M_t}{M_\infty}(t, T) = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \sum_{i=1}^{\infty} \frac{6}{i^2 \pi^2} e^{-i^2 \frac{\left(D_0 e^{\frac{-\Delta E}{R_g T}}\right)}{R_m^2} \pi^2 t} \quad (3.25)$$

Brauner y Shacham (1997) registraron elevados errores en los parámetros de Arrhenius para un sistema estudiado cuando se realiza un ajuste del tipo no lineal, comportamiento observado en el trabajo de Sánchez y col (2017). Brauner y Shacham (1997) atribuyeron los elevados errores a una interacción entre los parámetros para modelos no lineales, es así que propusieron una forma de reducirlos como se muestra en la ecuación (3.27).

$$D_{eff} = D'_0 e^{\frac{-\Delta E}{R_g} \left(1/T - 1/T_0\right)} \quad (3.26)$$

Donde:

$$D'_0 = D_0 e^{\frac{-\Delta E}{R_g T_0}} \quad (3.27)$$

Siendo:

T_0 : temperatura promedio del rango utilizado.

² Se adopta el término bidimensional para describir las dimensiones matemáticas correspondientes a las variables del modelo (t, T).

Combinando las ecuaciones (3.8), (3.14) y (3.26) se obtiene la ecuación (3.28):

$$\frac{M_t}{M_\infty}(t, T) = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \sum_{i=1}^{\infty} \frac{6}{i^2 \pi^2} e^{-i^2 \frac{\left(D_0' e^{\frac{-\Delta E}{Rg} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)}\right)}{R_m^2} \pi^2 t} \quad (3.28)$$

Para la aplicación de este modelo se asumió que M_0/M_∞ es independiente de la temperatura y se utilizó la ecuación (3.28) considerando los primeros 9 términos para ajustar los datos experimentales y calculando D_0 según la ecuación (3.27). La codificación del modelo en SigmaPlot 12.0 (2011) se muestra en el **Anexo A2**.

Los resultados del ajuste tomando los 9 primeros términos de la serie se observan en la **Tabla 3-6** y **Figura 3-10**.

Tabla 3-6. Coeficientes del modelo de difusión de Fick modificado bidimensional (función de tiempo y temperatura) ajustados para muestras sin pretratar y pretratadas con microondas (Microondas).

	Sin pretratar	Microondas
M_0/M_∞	0,24±0,01	0,26±0,01
$D_0 \cdot 10^9$ (m²/s)	3,3±0,7	9,2±0,4
ΔE (kJ/mol)	21,4±2,2	21,7±1,8
R^2_{ajus}	0,990	0,992
P del modelo	<0,0001	<0,0001

Para todos los parámetros $p \leq 0,0001$.

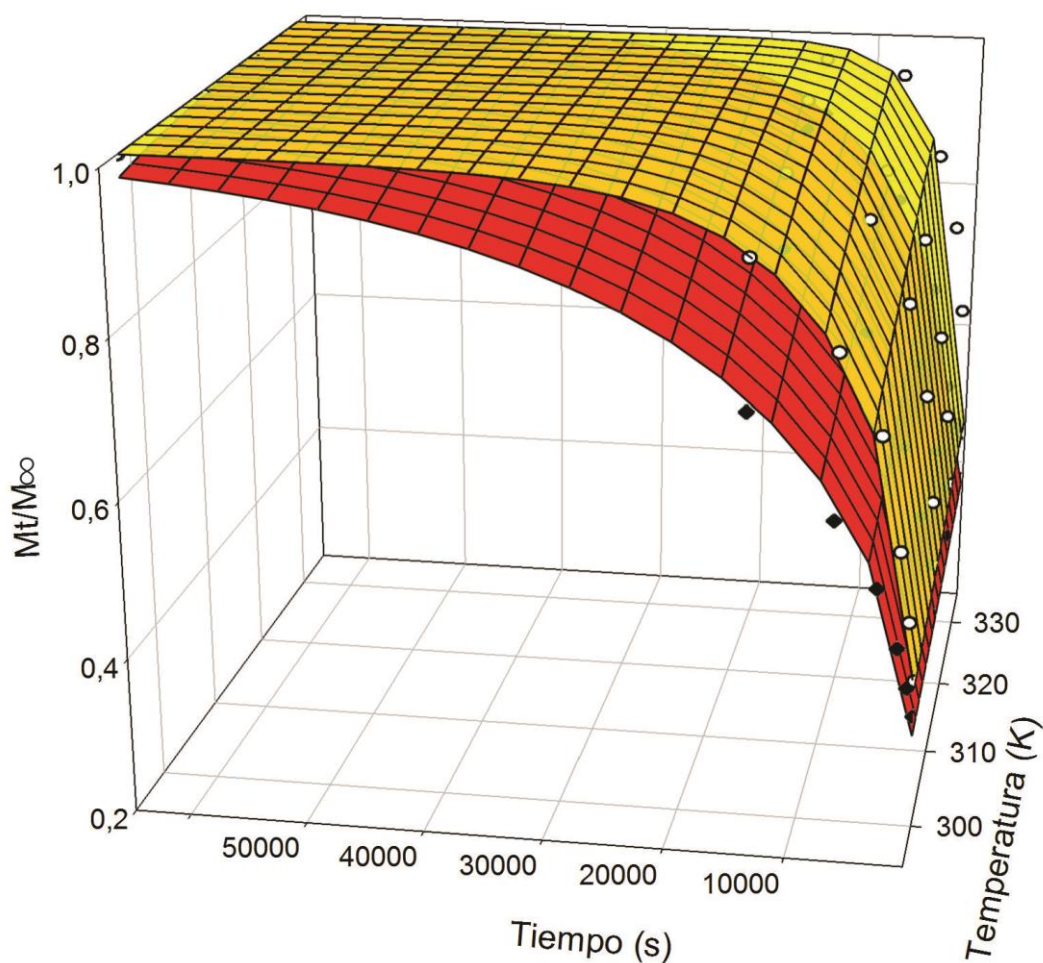


Figura 3-10. Rendimientos relativos para muestras pretratadas con microondas (amarillo) y sin pretratar (rojo) a distintas temperaturas y superficies de ajuste según ecuación 3.28 ($R^2_{\text{ajus}} = 0,992$; $p \leq 0,0001$ y $R^2_{\text{ajus}} = 0,990$; $p \leq 0,0001$; respectivamente).

Los valores de R^2_{ajus} y p indican la elevada correspondencia entre los datos experimentales y el modelo seleccionado. Asimismo los parámetros obtenidos son consistentes con los obtenidos en la sección previa.

3.3. MODELADO CON REDES NEURONALES ARTIFICIALES (RNA)

3.3.1. Metodología

3.3.1.1. Datos experimentales

Para estudiar el modelado por redes neuronales artificiales se utilizaron los datos de extracciones de aceite de canola sin pretratar (C_1) correspondientes al trabajo de Fernández y col. (2012), pretratados hidrotérmicamente (C_2) y sin pretratar correspondientes al trabajo de Zárate y col. (2015) y pretratados con microondas y sin pretratar correspondientes a la presente tesis (C_3). Los detalles de las tres muestras de canola se muestran en la **Tabla 3-7**. Los ensayos cinéticos realizados en todos los trabajos se llevaron a cabo como se indicó en la sección 3.2.1.3. A su vez, el pretratamiento hidrotérmico sobre granos de canola C_2 fue realizado por Zárate y col. (2015) en un autoclave a 393 K durante 5 minutos.

Tabla 3-7. Características de las muestras de canola.

	C_1	C_2	C_3
Humedad (%bs)	8,1±0,1	7,4±0,2	5,7±0,2
Aceite (%bs)	45,2±0,9	40,6±0,6	46,3±0,3
Proteína (%bs)	18,7±0,6	25,9±0,9	20,3±0,1

C_1 : canola utilizada por Fernández y col. (2012). C_2 : canola utilizada por Zárate y col. (2015). %bs: base seca. C_3 : canola utilizada pretratada con microondas y sin pretratar.

3.3.1.2. Red neuronal artificial (RNA)

Se utilizó una red perceptrón feedforward multicapa (MLP, por sus siglas en inglés) totalmente interconectada, a su vez en este trabajo, se utilizaron las categorías muestra de canola (x_1) y pretratamiento (x_2), y las variables temperatura (x_3) y tiempo (x_4), como datos de entrada, mientras que el

rendimiento de aceite relativo al rendimiento a tiempo infinito (64800 s) para cada experimento se consideró como dato de salida (z); componiendo los vectores entrada y salida como se indica en la ecuación (3.29).

$$X = \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{bmatrix}, \quad Z = [z] \quad (3.29)$$

Para las categorías muestra de canola (v_1) y pretratamiento (v_2) se asignaron números de 0 a 2 a cada condición como se indican en la **Tabla 3-8**.

Tabla 3-8. Datos de entrada a la RNA.

*Muestra de Canola	**Pretratamiento	Rango de temperatura (K)	Rango de tiempo (s)
1	0	313-333	300-64800
2	0	298-333	300-64800
2	1	298-333	300-64800
3	0	298-333	300-4800
3	2	313-333	300-64800

*1: C₁; 2: C₂; 3: C₃.

** 0: sin pretratar; 1: pretratamiento Hidrotérmico; 2: pretratamiento con Microondas.

Con el fin de asegurar un modelado exitoso, se deben considerar dos factores importantes. En primer lugar, el número de capas y en segundo lugar el número de neuronas en cada capa oculta. Puesto que muchos problemas prácticos de modelado con redes neuronales podría resolverse con una capa oculta (Rafiq y col., 2001), se utilizó una RNA con dos capas (una capa oculta y una capa de salida) y un algoritmo de retro propagación (Backpropagation, BP) como algoritmo de entrenamiento supervisado, ya que proporciona un ajuste rápido y es fácilmente aplicable (Shokri y col., 2011). Para el ajuste de los pesos se empleó el algoritmo Levenberg-

Marquardt, el cual permite una convergencia más rápida que los métodos de gradiente descendente (Hagan y col., 1996). El conjunto de datos se dividió en tres partes: entrenamiento, validación y predicción. Los grupos de entrenamiento y validación se utilizaron para ajustar los parámetros del modelo, mientras que el grupo de predicción se utilizó para evaluar su potencia de predicción.

Se utilizaron 88, 22 y 22 del total de 132 datos para construir los grupos de entrenamiento, validación y predicción, respectivamente. Para la selección de datos de entrenamiento se aplicó el método modificado de Jenkin (Rafiq y col., 2001) a los datos correspondientes a cada categoría, el conjunto seleccionado se utilizó para entrenar la red y el resto de los datos fue dividido aleatoriamente para conformar los grupos de validación y predicción. El entrenamiento se realizó hasta un máximo de 1000 épocas o hasta que el cuadrado medio del error (mse) de los datos de validación llegó a un mínimo, evitando de esta forma un sobre-entrenamiento de la red (Hagan y col., 1996).

La cantidad óptima de neuronas en la capa oculta se determinó mediante un proceso de prueba y error (Lertworasirikul y Saetan, 2010; Fathi y col., 2011; Ramzi y col., 2015), minimizando el valor de cuadrado medio del error (mse) para los datos de validación. Se seleccionaron las funciones de activación “tansig” y “purelin” de Matlab R2013B (2013) para la capa oculta y la capa de salida respectivamente, las mismas fueron utilizadas por otros autores (Shokri y col., 2011), y se describen en las ecuaciones (3.30) y (3.31).

$$tansig(x) = \frac{2}{1+e^{-2x}} - 1 \quad (3.30)$$

$$purelin(x) = x \quad (3.31)$$

Se utilizaron la raíz del cuadrado medio del error (RMSE) y el coeficiente de determinación cuadrático (R^2) calculados mediante el uso de las ecuaciones (3.32) y (3.33) para evaluar la exactitud de los modelos (Fathi y col., 2011).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (z_i^{exp} - z_i^{pred})^2}{N}} \quad (3.32)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (z_i^{exp} - z_i^{pred})^2}{\sum_{i=1}^N (z_i^{exp} - \bar{z}^{mexp})^2} \quad (3.33)$$

Donde:

z_i^{exp} : valor de la respuesta experimental para el i -ésimo dato.

z_i^{pred} : valor predicho para el i -ésimo dato.

\bar{z}^{mexp} : valor de la respuesta promedio.

N: número total de datos.

Para el procesamiento de los datos y el diseño y entrenamiento de la RNA se utilizó el software Matlab R2013B (2013).

3.3.1.3. Pre-procesamiento de los datos

Es posible lograr mayor eficiencia en el entrenamiento de la red neuronal pre procesando los datos de entrada y salida antes de ingresarlos a la red. Dado que la forma en que los datos son presentados afecta el aprendizaje de la red, se recomienda normalizar los datos de entrada y de salida antes de presentarlos a la red (Rafiq y col., 2001). Los datos fueron normalizados para cada entrada y salida obteniendo promedio cero y desviación estándar unitaria mediante la función “mapstd” del software Matlab R2013B (2013).

3.3.2. Resultados y discusión

3.3.2.1. RNA óptima

La RNA con 11 neuronas en la capa oculta proporcionó los mejores resultados, la **Figura 3-11** representa un diagrama esquemático de la estructura de la red adoptada.

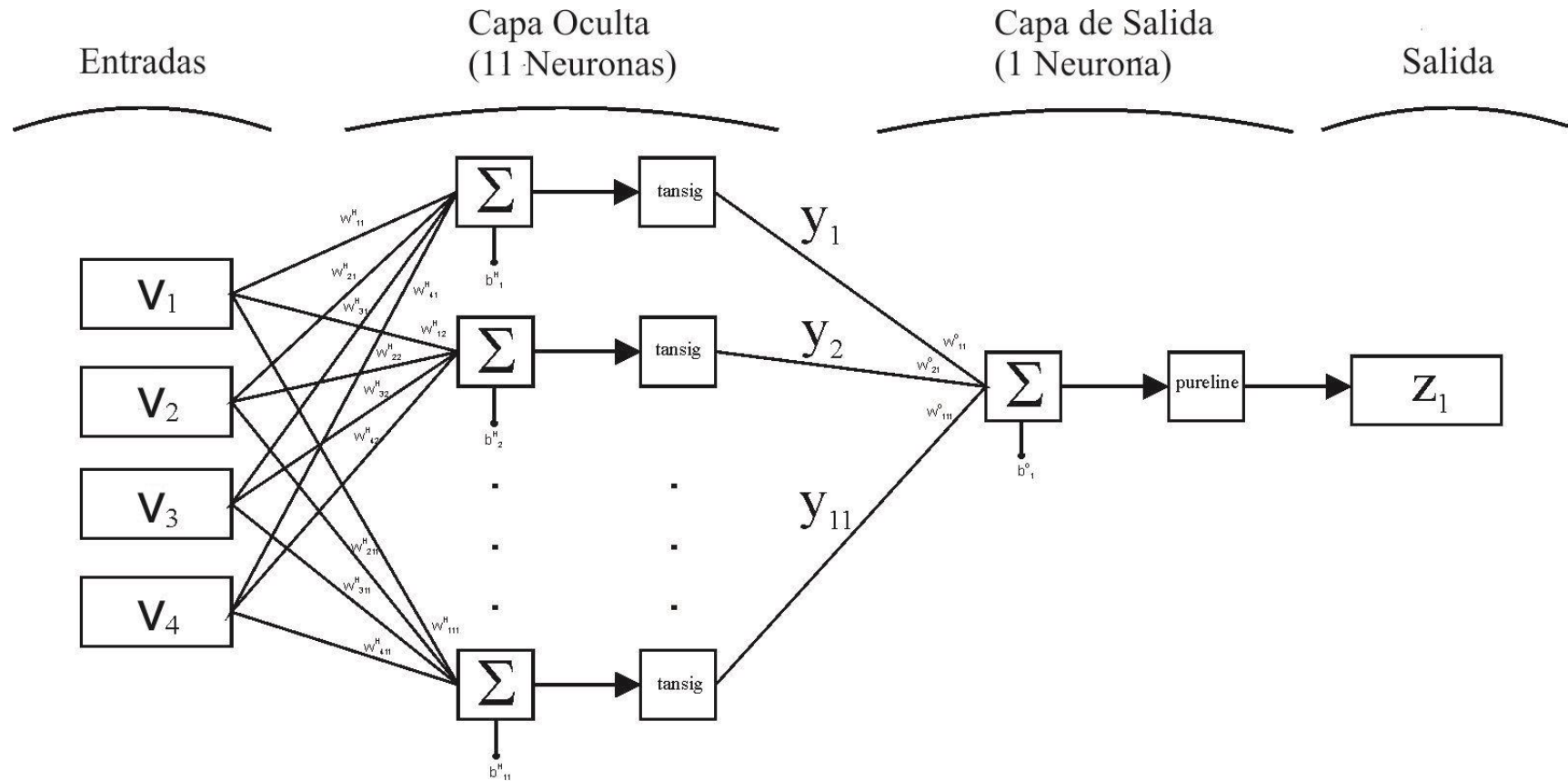


Figura 3-11. Diagrama esquemático del modelo óptimo de RNA feedforward multicapa encontrado. v_i : i -ésima entrada; w_{Hij} : peso correspondiente a la i -ésima entrada de j -ésima neurona de la capa oculta; b_{Hj} : umbral de la j -ésima neurona de la capa oculta; w_{Ojk} : peso correspondiente a la j -ésima entrada de la k -ésima neurona de la capa de salida; b_{Ok} : umbral de la k -ésima neurona de la capa de salida; tansig : función tangente sigmoidea; purelin : función identidad; y_j : salida de la neurona j de la capa oculta; z_1 : salida de la RNA.

Por otro lado, en la **Figura 3-12** se puede apreciar la evolución del error cuadrado medio (mse) de la red a lo largo del entrenamiento comenzando en un valor elevado y decreciendo a lo largo del proceso. En la gráfica se aprecian tres curvas, correspondientes al grupo de entrenamiento, validación y prueba. Cuando el error de validación encuentra un valor mínimo el entrenamiento se detiene obteniendo los valores de los pesos y umbrales.

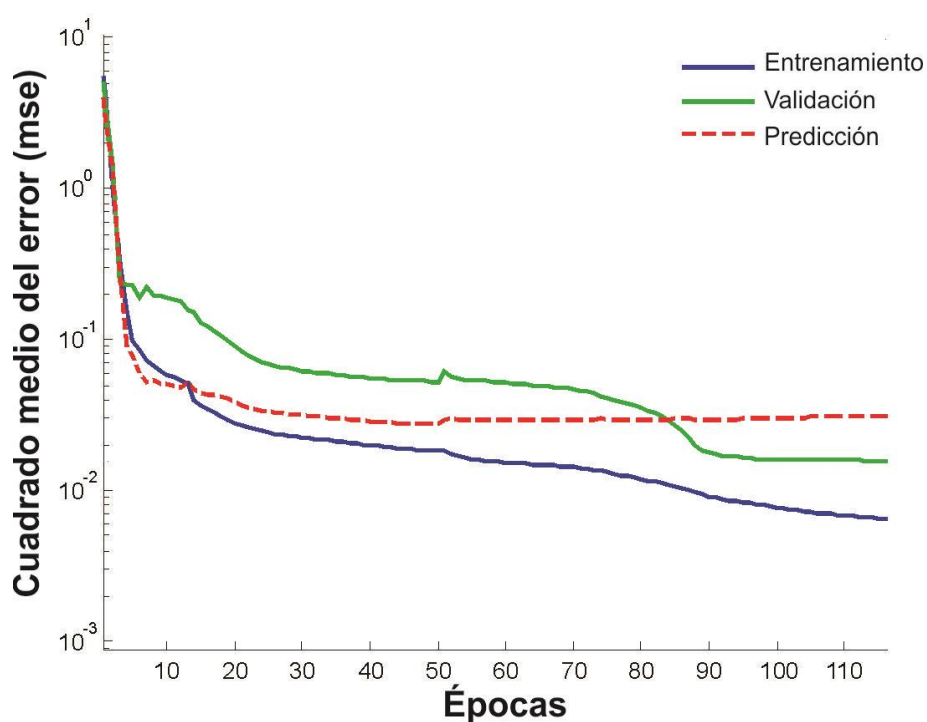


Figura 3-12. Criterio de detención y tendencias del error cuadrado medio (mse) de los grupos de entrenamiento, validación y predicción en función de las épocas (Épocas).

A su vez, en la **Tabla 3-9** se informan los pesos (w) y umbrales (b) correspondientes a cada neurona. La capa oculta contiene 44 pesos y 11 umbrales, mientras que la capa de salida contiene 11 pesos y 1 umbral.

Tabla 3-9. Parámetros de la RNA óptima

Parámetros de la capa oculta						Parámetros de la capa de salida	
						b	-2,1780
w					b	w	
Neurona	Muestra de Canola	Pretratamiento	Temperatura	Tiempo		Neurona	w
1	-1,6334	0,1902	-0,7136	0,4086	4,4449	1	1,0714
2	0,7717	-3,2816	0,2659	2,5444	-2,2438	2	-2,5873
3	-2,6158	-3,2858	-0,2524	-1,0787	-0,8224	3	-2,1501
4	0,6275	1,0305	-0,2429	1,9419	2,6097	4	-2,6155
5	2,9243	-2,3986	-0,2912	7,4568	5,5626	5	2,0292
6	1,0417	3,2865	1,9430	-1,9068	0,1845	6	0,2422
7	2,3303	6,8163	0,0243	-3,3845	0,8097	7	-5,5820
8	3,9305	2,6794	-0,2965	0,1054	0,1791	8	2,4594
9	7,1583	-4,3185	0,1781	-8,2811	2,2701	9	-4,4016
10	-1,6833	4,5054	-0,1672	6,0815	8,9030	10	2,5599
11	-1,2818	-1,5794	-0,0946	2,3795	-1,0210	11	-2,6021

b: umbral asociado a una neurona. w: Peso asociado a una entrada.

La **Figura 3-13** muestra la comparación entre los datos experimentales y predichos por la red.

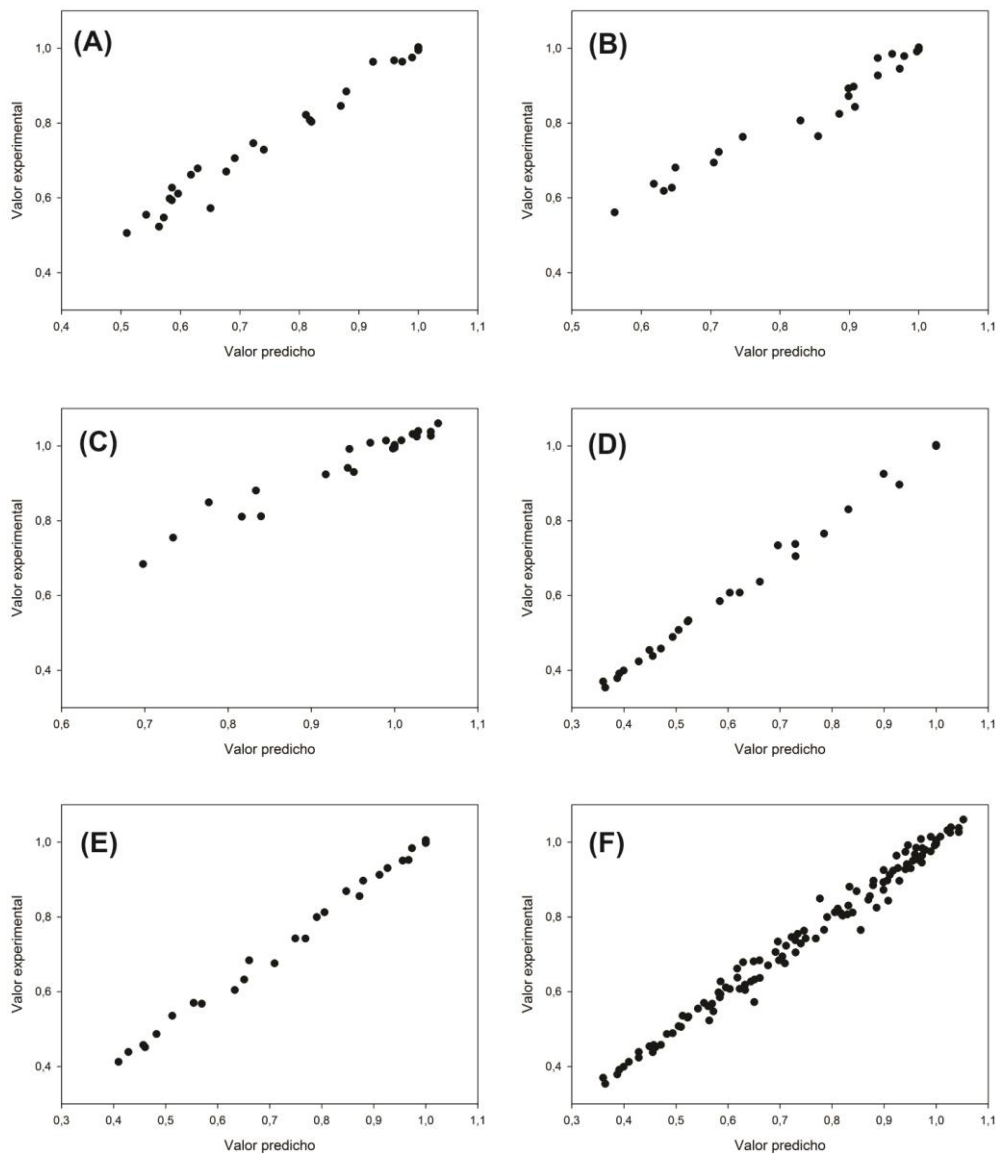


Figura 3-13. Valores experimentales y predichos por la RNA. ϕ : coeficiente lineal de la recta de correlación. ψ : término independiente de la recta de correlación. (A) Muestra C₁ sin pretratar. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,984$ (B) Muestra C₂ sin pretratar. $\phi = 0,99$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,973$ (C) Muestra C₂ pretratada hidrotérmicamente. $\phi = 0,96$, $\psi = 0,05$, $R^2 = 0,923$. (D) Muestra C₃ sin pretratar. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,993$ (E) Muestra C₃ pretratada con microondas. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,993$ (F) Datos totales. $\phi = 1$, $\psi = 0$, $R^2 = 0,988$.

Los resultados muestran una recta de correlación con coeficiente lineal unitario y término independiente igual a cero para todos los casos con excepción de la muestra C₂, que presentaron coeficiente lineal 0,99 en el caso de la muestra sin pretratamiento y coeficiente lineal 0,96 y término independiente 0,05 para la muestra pretratada hidrotérmicamente.

En la **Figura 3-13** se puede observar generalmente un buen ajuste de los datos experimentales por este modelo para todos los experimentos; indicando que el modelo de RNA desarrollado permite predecir adecuadamente la cinética de extracción con n-hexano de aceite de canola para el rango de variables estudiadas.

En la **Tabla 3-10** se compara el modelo de RNA y modelos de difusión (MD) correspondientes a cada experiencia (C₁, C₂ y C₃). Se observa generalmente mayor precisión de ajuste de la RNA con respecto al modelo MD correspondiente. Estos resultados fueron similares a los reportados por otros autores quienes modelaron la transferencia de masa durante la deshidratación de piel de lima kaffir (Lertworasirikul and Saetan, 2010) y la extracción con dióxido de carbono cerca del punto crítico de anise (Shokri y col., 2011) mediante RNA y modelos matemáticos, obteniendo mayor precisión en los modelos por RNA con respecto a los matemáticos. Cabe destacar que la RNA permite ajustar los datos de todas las condiciones estudiadas a partir de un solo modelo; facilitando su aplicación práctica.

Tabla 3-10. Comparación de RMSE y R^2 entre los MD y el modelo de RNA para distintas variables operativas.

Muestra de Canola	Pretratamiento	T(K)	RNA		Modelo de Difusión (MD)		
			R^2	RMSE	Modelo	R^2	RMSE
C₁ (Fernández y col., 2012)	-	298	0,997	0,0132	$z(v_4) = 1 - 0,464e^{-0,000100v_4}$	0,977	0,0487
	-	313	0,964	0,0337	$z(v_4) = 1 - 0,464e^{-0,000131v_4}$	0,952	0,0330
	-	323	0,990	0,0173	$z(v_4) = 1 - 0,464e^{-0,000160v_4}$	0,965	0,0176
	-	333	0,991	0,0151	$z(v_4) = 1 - 0,464e^{-0,000246v_4}$	0,950	0,0237
C₂ (Zárate y col., 2015)	-	313	0,978	0,0280	$z(v_4) = 1 - 0,455e^{-0,000237v_4}$	0,940	0,0275
	-	323	0,979	0,0186	$z(v_4) = 1 - 0,455e^{-0,000416v_4}$	0,930	0,0344
	-	333	0,969	0,0253	$z(x_4) = 1 - 0,455e^{-0,000559v_4}$	0,910	0,0222
	Hidrotérmico	313-333	0,923	0,0301	$z(x_4) = 1 - 0,304e^{-0,000734v_4}$	0,850	0,0324
C₃ (Sección 3.2.2.7)	-	298-333	0,993	0,0181	$z(v_3, v_4) = 1 - 0,462 \sum_{n=1}^9 \frac{1}{n^2} e^{-\left(0,233e^{-2571,6\frac{1}{v_3}}\right)n^2v_4}$	0,990	0,0207
	Microondas	298-333	0,994	0,0157	$z(v_3, v_4) = 1 - 0,450 \sum_{n=1}^9 \frac{1}{n^2} e^{-\left(0,677e^{-2611,3\frac{1}{v_3}}\right)n^2v_4}$	0,992	0,0174

z: rendimiento relativo de extracción de aceite; v_3 : temperatura (K); v_4 : tiempo de extracción (s).

3.3.2.2. Datos simulados por modelos MD y RNA

A su vez, con el fin de determinar la correspondencia entre los modelos RNA y los modelos MD se simularon respuestas z_1 para variables seleccionadas aleatoriamente dentro del rango de las variables de la RNA (**Tabla 3-9**) y con el modelo MD correspondiente en cada caso. Los resultados se muestran en la **Tabla 3-11**.

Se observa que la diferencia máxima entre los valores predichos con ambos tipos de modelo es de 0,07 mientras que la diferencia mínima es nula; mostrando correspondencia entre las predicciones de la RNA y el modelo de difusión de Fick modificado.

El modelo por RNA es capaz de ajustar y predecir adecuadamente la cinética de extracción de aceite de canola con solvente a distintas temperaturas, para las muestras de granos y pretratamientos estudiados.

Tabla 3-11. Comparación entre respuestas simuladas por los modelos difusivos (MD) y el modelo de RNA para distintas variables operativas.

Muestra de Canola	Pretratamiento	Temperatura (K)	Tiempo (s)	Respuesta z RNA	Respuesta z MD	Diferencia RNA-MD
C₁ (Fernández y col., 2012)	Sin pretratar	298	3000	0,61	0,66	0,05
		313	500	0,55	0,57	0,02
		323	2000	0,68	0,66	0,02
		333	1400	0,69	0,67	0,02
		313	6000	1,00	0,96	0,04
		323	800	0,93	0,90	0,03
		333	13000	1,06	1,00	0,06
C₂ (Zárate y col., 2015)	Sin pretratar	313	800	0,59	0,62	0,04
		323	3000	0,84	0,87	0,03
		333	11000	0,93	1,00	0,07
	Hidrotérmico	323	1000	0,90	0,85	0,05
		328	64800	1,01	1,00	0,01
		313	400	0,83	0,80	0,03
		323	15000	1,03	0,97	0,07
		333	5000	0,98	0,91	0,07
C₃ (sección 3.2.2.7)	Sin pretratar	307	4331	0,59	0,59	0,01
		326	8363	0,74	0,78	0,04
		341	12394	0,89	0,87	0,02
	Microondas	311	300	0,43	0,43	0,00
		330	4313	0,83	0,82	0,01
		341	16425	0,97	1,00	0,02

3.4. CONCLUSIONES PARCIALES

El pretratamiento con microondas afectó la extracción de aceite con n-hexano, registrándose aumentos significativos debido al mismo.

El análisis de la cinética de extracción de aceite de canola con n-hexano mostró que el modelo de difusión de Fick modificado, bajo las condiciones evaluadas, resultó adecuado tanto para la muestra pretratada con microondas como sin pretratar y para todas las temperaturas analizadas, con $R^2_{\text{ajus}} > 0,98$. A su vez, tanto para la muestra pretratada como sin pretratar, permitió calcular los coeficientes de difusión efectiva (D_{eff}) los cuales presentaron una dependencia del tipo Arrhenius con la temperatura ($R^2 \geq 0,93$), mientras que no se detectó dependencia del parámetro de fracción de lavado (M_0/M_∞) con la temperatura. Se detectaron diferencias en los valores y/o tendencias de las fracciones de lavado y/o D_{eff} al comparar las cinéticas de extracción de aceite de canola de granos pretratados con microondas, pretratados hidrotérmicamente y sin pretratar. El análisis de los parámetros del modelo permitió desarrollar el modelo de difusión de Fick modificado bidimensional dependiente de la temperatura y el tiempo, el cual permitió correlacionar la totalidad de los datos obtenidos (300-64800 s y 298-333 K), tanto para las muestras pretratadas como sin pretratar, con elevados coeficientes de correlación ($R^2_{\text{ajus}} \geq 0,99$). Este modelo permitió observar un aumento en el parámetro pre exponencial de Arrhenius (D_0) debido al pretratamiento, lo que evidenciaría la influencia de la radiación con microondas sobre la estructura de la muestra, facilitando el proceso de extracción de aceite por n-hexano.

A su vez, se modeló la cinética de extracción con n-hexano de aceite de canola, a distintas temperaturas (298-333 K) para 3 muestras de granos de canola y distintos pretratamientos (sin pretratar, Microondas, Hidrotérmico), con Redes Neuronales Artificiales (RNA). Para el modelado RNA, el conjunto de datos se dividió en tres partes: 2/3 de los datos para el entrenamiento y ajuste de los parámetros del modelo, 1/6 para la validación evitando un sobre-entrenamiento y 1/6 para ensayos de predicción del modelo y se utilizó el algoritmo Levenberg-Marquardt para el ajuste de los parámetros, con funciones de activación "tansig" para las capa oculta y "purelin" para la capa de salida. El mejor resultado se obtuvo con una red neuronal con una capa oculta, 11 neuronas en la capa oculta. Los elevados valores de coeficientes de correlación (R^2) entre la predicción de la red y los datos experimentales correspondientes y los bajos valores de la raíz de los cuadrados medios del error (RMSE) muestran la factibilidad del uso de las RNA para modelar los procesos de extracción de aceite de canola, presentando generalmente mayor precisión que los modelos difusivos (MD). El desarrollo de un solo modelo RNA para modelar la cinética de extracción de aceite en el rango de las variables estudiadas y para distintas condiciones (muestra de canola, pretratamientos, temperatura) presenta ventajas prácticas con respecto a los modelos MD tanto el desarrollado en esta tesis como estudiados por otros autores, facilitando potencialmente su transferencia a la industria.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Publicaciones en revistas científicas

- Bidimensional Modeling Applied to Oil Extraction Kinetics of Microwave-Pretreated Canola Seeds. (2017). Ramiro J. Sánchez, Carmen M. Mateo, María B. Fernández, Susana M. Nolasco. *Journal of Food Engineering*, 122, 28-35.
- Artificial Neural Network Model for Canola Oil Extraction Kinetics for Different Samples and Pretreatments. (2018). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco; *Journal of Food Process Engineering*. 41 (1), 1-7, e12608.
- An Approach for Modified Fick's Diffusion Model Application: Development of an Algorithm. Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco (En redacción).

Presentaciones en congresos

- Aplicación de Redes Neuronales Artificiales (RNA) en la predicción y modelado de la cinética de extracción de aceite de canola. Sánchez, R; Fernández, M.; Nolasco, S. (2015). VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química (CAIQ2015) – Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 2 – 5 de agosto de 2015. ISSN N° 1850 3519.
- Cinética de extracción de aceite de granos de canola pretratados con microondas. Sánchez, R; Fernández, M.; Nolasco, S. (2015). XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los alimentos (XV CYTAL) – Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 3 – 5 de noviembre de 2015. ISBN N° 978-987-22165-7-3

- Extracción de aceite de granos pretratados con microondas: Influencia de la temperatura. (2015). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco. World Congress on oil and Fats and 31st ISF Lectureship series – XVI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites – Rosario, Santa Fe, Argentina, 31 de octubre – 4 de noviembre de 2015. ISBN N° 978-987-22799-2-9.

CAPITULO 4

**EXTRACCIÓN DE ACEITE DE CANOLA UTILIZANDO
ETANOL COMO SOLVENTE****4.1. INTRODUCCIÓN**

El n-hexano es el solvente más utilizado en la industria aceitera, ya que es estable, presenta un alto poder solubilizante y un conveniente punto de ebullición lo que favorece su recuperación (Sicaire y col., 2015). No obstante, este solvente obtenido de combustibles fósiles, genera la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y es altamente inflamable, originando un aumento en los costos de los sistemas de seguridad industrial y ocasionando efectos negativos al medio ambiente y la salud. A su vez, la harina obtenida luego del proceso de extracción de aceite debe ser desolventizada para su posterior uso (elaboración de concentrados proteicos y alimentación animal), proceso que representa pérdidas de solvente y un alto costo energético.

Solventes verdes

Han adquirido importancia en el ámbito académico e industrial las investigaciones sobre solventes biodegradables y seguros, los llamados solventes “verdes”. Entre los solventes verdes, los agro o biosolventes juegan un papel importante para el reemplazo de solventes petroquímicos. Son un recurso renovable producido a partir de biomásas como madera, almidón, aceites vegetales o frutas; dentro de los cuales los más difundidos son el etanol e isopropanol. Estos biosolventes tienen un alto poder disolvente, son

biodegradables y no tóxicos. Sus limitaciones e inconvenientes se deben a la alta viscosidad, el alto punto de ebullición y la generación de sabores extraños.

En esta categoría de agro o bio-solventes, podemos encontrar también terpenos extraídos de pino (α -pineno) o cítricos (d-limoneno), de baja polaridad y gran poder disolvente. El d-limoneno puede usarse para la extracción de grasa y aceites, Virost y col. (2008) lo utilizaron para la extracción de lípidos totales de olivos *Aglandau*. Los ésteres de metilo de los ácidos grasos del aceite vegetal también pueden reemplazar a los solventes petroquímicos como el n-hexano. Por otra parte, Sicaire y col. (2015) estudiaron la extracción de aceite de colza utilizando como solvente el 2-metiltetrahidrofurano, obteniendo rendimientos similares a los alcanzados con n-hexano.

El CO₂ supercrítico es uno de los solventes verdes mayormente utilizado, la extracción de CO₂ supercrítico se ha comenzado a aplicar en la extracción de compuestos débilmente polares de alto peso molecular como carotenoides, triglicéridos, ácidos grasos, etc. Por ejemplo, Stahl y col. (1980) realizaron la extracción supercrítica con dióxido de carbono de aceite de girasol.

Etanol: antecedentes en extracción de aceite

Como se describió en el Capítulo 1, aunque es inflamable y potencialmente explosivo, el etanol se usa en la extracción industrial de compuestos porque es fácilmente disponible en alta pureza, tiene un precio bajo y es completamente biodegradable.

La solubilidad de aceites vegetales, entre ellos el aceite de colza, en etanol ha sido estudiada en décadas previas (Rao y Arnold, 1956). Hron y Koltun (1984) desarrollaron un proceso de extracción de aceite para semillas de algodón utilizando una mezcla de etanol y agua, separando el aceite del extracto obtenido por enfriamiento y decantación. Recientemente se estudió la extracción de aceite de soja utilizando distintas proporciones de etanol-agua como solvente, dando como resultado la extracción de una fracción de proteínas además del aceite (Sawada y col., 2014). A su vez, Baümler y col. (2016) estudiaron la extracción de aceite de colza de girasol utilizando etanol como solvente, reportando la extracción de insolubles en aceite como azúcares, entre otros; y separándolos mediante un fraccionamiento con n-hexano.

Con respecto al uso a nivel industrial, Linnet (International Publication Number WO 2014/053180, 2004) describió un proceso de extracción de aceites vegetales utilizando etanol como solvente, mostrando el uso potencial de este tipo de procesos verdes a nivel industrial. A su vez, Carré y col. (2018) evaluaron la viabilidad económica de un proceso de extracción de aceite de colza con etanol, encontrando mayores costos en el pretratamiento de los granos pero obteniendo productos de mayor valor que en los procesos convencionales.

Extracción de compuestos minoritarios

La canola presenta un alto contenido de compuestos fenólicos (6390 -18370 µg/g en harina desgrasada; Kozłowska y col., 1990), entre ellos se ha detectado la presencia de canolol como se describió en el Capítulo 2.

Debido a la naturaleza polar del etanol podría lograrse la extracción de compuestos minoritarios de importancia nutricional y antioxidantes, como compuestos tocoferoles y canolol, elevando la calidad del aceite obtenido. En los capítulos previos se estudió la influencia del pretratamiento con microondas sobre la matriz a extraer, en el rendimiento de extracción con n-hexano y en la calidad de los aceites obtenidos, registrando un aumento en la concentración de Canolol en el aceite por efecto del microondas.

Objetivos

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- Estudiar y definir las etapas necesarias para llevar a cabo el proceso de extracción sólido-líquido del aceite de granos molidos de canola empleando como solvente etanol, comparando estos procesos con la extracción sólido-líquido con n-hexano.
- Estudiar el efecto del pretratamiento mediante microondas de granos de canola sobre el rendimiento, índices de calidad y componentes menores (tocoferoles y canolol) del aceite obtenido utilizando el proceso de extracción sólido-líquido (etanol).

En primer lugar se estudia la extracción con solvente utilizando etanol y un posterior lavado con n-hexano, a partir de granos sin pretratar con microondas, analizando el fenómeno involucrado y su comparación con extracciones con n-hexano. A su vez, se estudia la cinética de extracción con etanol a partir del modelo de difusión de Fick modificado bidimensional desarrollado en el Capítulo 3. Luego se analiza el efecto del

pretratamiento con microondas de los granos sobre la extracción del aceite con etanol.

Posteriormente se desarrolla un proceso de obtención de aceite libre de n-hexano, comparando los rendimientos obtenidos con el proceso utilizado en primera instancia (etanol-lavado con n-hexano).

Finalmente, se realiza una caracterización de todas las fracciones obtenidas mediante los procesos desarrollados previamente.

4.2. CINÉTICA DE EXTRACCIÓN

4.2.1. Materiales y métodos

4.2.1.1. Tratamiento antes de la extracción

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.2.1.1, obteniendo dos muestras con un tamaño de partícula de 0,42-1,00 mm: una muestra pretratada con microondas y una muestra sin pretratar.

4.2.1.2. Extracción de aceite

El proceso de extracción se realizó en un dispositivo batch con un agitador magnético a distintos tiempos de extracción (300 a 64.800 s) y a 333 K (temperatura óptima encontrada por Sawada y col. (2014) para la extracción de aceite de collects de soja) para ambas muestras. Se utilizaron 5 g de muestra y se pusieron en contacto con 85 mL de etanol (misma relación utilizada en el estudio de la cinética en el Capítulo 3) de grado técnico (BIOPACK, $\geq 99,0\%$). El solvente (etanol 99%) se seleccionó teniendo en cuenta la solubilidad del aceite de colza en mezclas de etanol y agua descrito por Rao y Arnold (1956), siendo la más alta para etanol 99%

(aproximadamente 12% peso/peso a 60 °C). Transcurrido cada tiempo preestablecido, la micela se separó de la harina por centrifugación en un equipo Thermo SCIENTIFIC, SORVALL LEGEND X1 (Alemania) durante 5 minutos a 14069 G. Posteriormente se filtró el sobrenadante, la micela se recogió en un balón (Et). Como se muestra en la **Figura 4-1**, el solvente se evaporó en un evaporador rotatorio R-3000 Büchi (Suiza) obteniendo el extracto total libre de solvente (E), al cual para cuantificar la fracción lipídica, se le adicionó 10 mL de n-hexano, se agitó y luego se filtró. El proceso se repitió una vez. De la solución recogida se evaporó el n-hexano, obteniendo el aceite como fracción de extracto soluble en n-hexano (Fracción lipídica, FL). La cuantificación de ambas fracciones (E y FL) se realizó gravimétricamente y todos los ensayos se realizaron por duplicado.

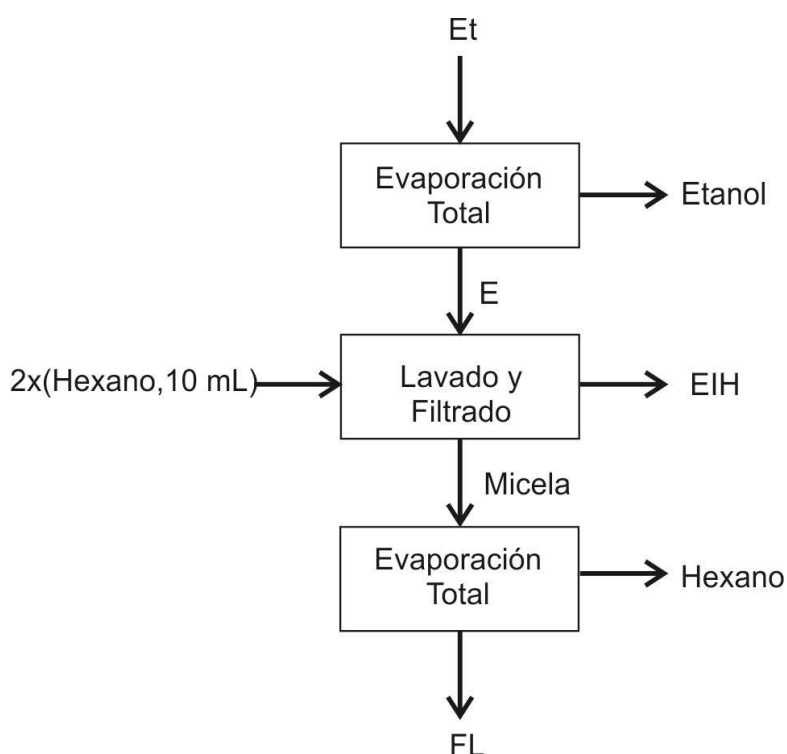


Figura 4-1 Proceso de obtención de fracción lipídica (FL) por lavado con n-hexano. Et: extracto total. E: extracto total libre de solvente. EIH: extracto insoluble en n-hexano.

4.2.1.3. Dependencia de la extracción con la temperatura

Con el fin de estudiar la dependencia con la temperatura, para las muestras sin pretratar se realizó la extracción a distintos tiempos (300 a 64800 s) y a temperaturas de 313 y 323 K.

4.2.1.4. Modelo matemático

Se utilizó el modelo de difusión de Fick modificado (ecuación 3.14); y el modelo de difusión de Fick modificado bidimensional (ecuación 3.28), siguiendo el procedimiento especificado en la sección 3.2.2.3. aplicado a la muestra sin pretratar.

Como se especificó en el Capítulo 3, la cantidad de extractos obtenidos en 64800 s fueron identificados como rendimiento a tiempo infinito (M_{∞}).

Los datos experimentales fueron ajustados con el modelo utilizando el software SigmaPlot 12.0 (2011).

4.2.1.5. Micrografía electrónica de barrido (SEM)

Para detectar diferencias estructurales en las muestras se realizaron micrografías electrónicas de barrido (SEM) de las muestras pre y pos extracción a 333 K durante 14.400 s utilizando etanol y n-hexano (Capítulo 3) como solvente, tomadas con un microscopio electrónico de barrido con presión variable LEO EVO 40-XVP (Inglaterra), a 15 kV. La presión se varió de 40 a 70 Pa.

4.2.1.6. Análisis estadístico

Para el análisis de los rendimientos de extracción y el efecto del microondas se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) de dos vías en conjunto con el Test de Duncan para comparar las medias el cual se considera adecuado

para tratamientos que presentan una relación ordinal (Wong-Gonzalez, 2010).

Con respecto a los modelos, se compararon para el rendimiento de extracto total libre de solvente (E) y el rendimiento extracto soluble en n-hexano (FL) a partir del principio de suma de cuadrados medios (ESC) con el fin de determinar si existen diferencias en los modelos para ambos rendimientos. La hipótesis nula propuesta (H_0) y la hipótesis alternativa (H_1) se expresan por las siguientes afirmaciones:

H_0 : Los coeficientes M_0/M_∞ y/o D_0 y/o ΔE no dependen de E o FL (Modelo global).

H_1 : Los coeficientes M_0/M_∞ , D_0 y ΔE dependen de E y FL (Modelo de parámetros individuales).

El estadístico de contraste F_0 se obtuvo a partir de ESC para cada modelo, lo que permitió la comparación de los modelos asociados a cada uno de los métodos de comparación de hipótesis, con la ayuda del estadístico de contraste F_c . Se probó la falta de ajuste utilizando el método de comparación directa con la ayuda del estadístico de contraste F_0^{dc} descrito en la sección 3.2.1.5.

4.2.2. Resultados y discusión

4.2.2.1. Rendimientos de extracción a diferentes temperaturas

En las **Figuras 4-2, 4-3 y 4-4** se muestran los rendimientos de E y FL a 313, 323 y 333 K respectivamente.

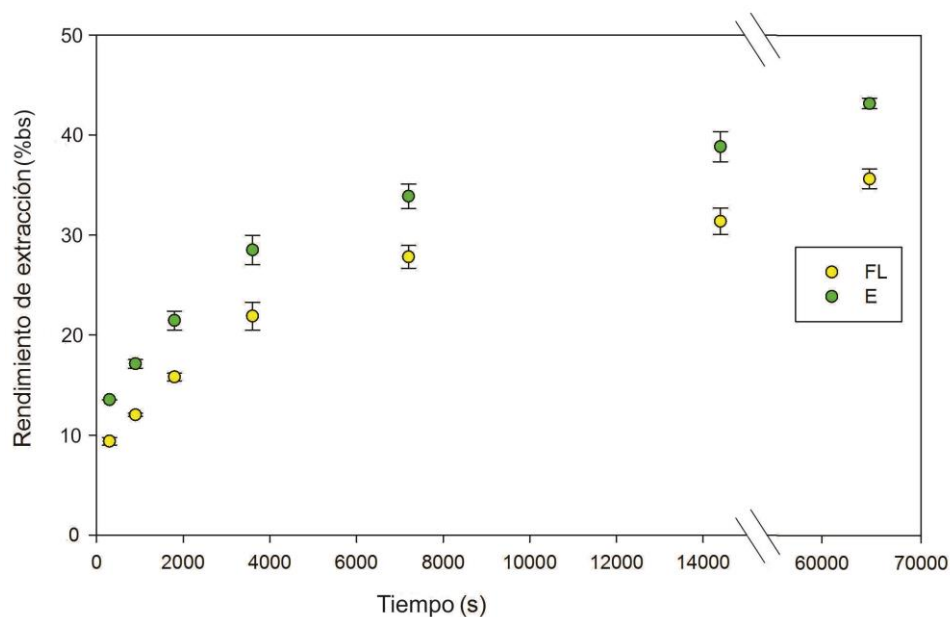


Figura 4-2. Rendimientos de E y FL a 313 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. E: extracto total libre de solvente.

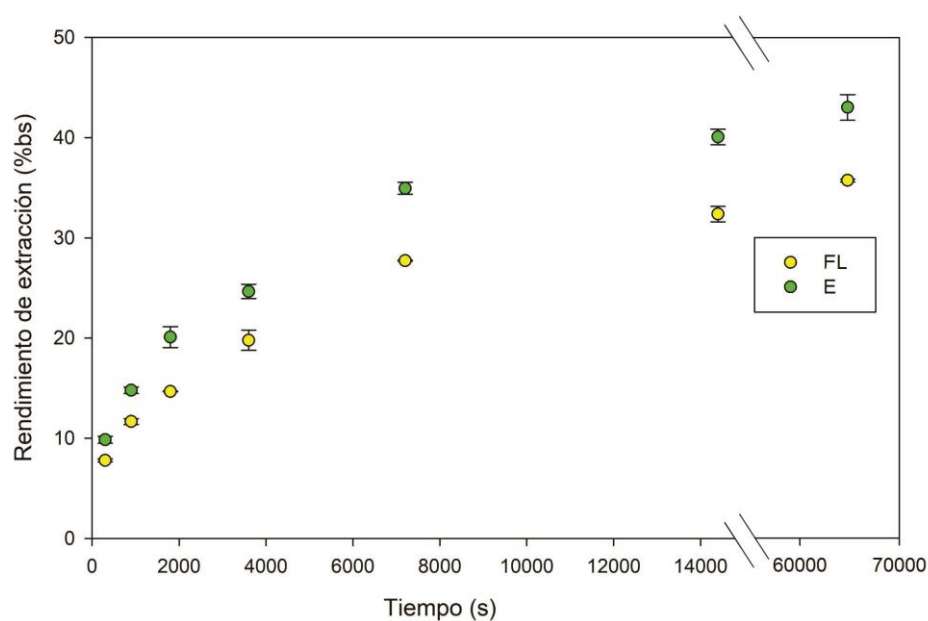


Figura 4-3. Rendimientos de E y FL a 323 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. E: extracto total libre de solvente.

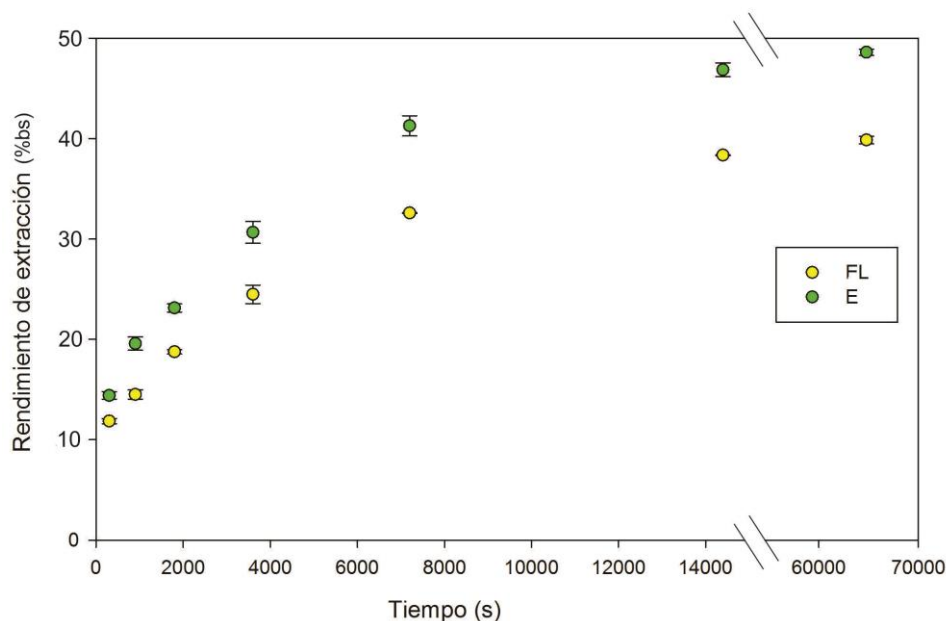


Figura 4-4. Rendimientos de E y FL a 333 K, y relación sólido:solvente 1:17 para granos de canola. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. E: extracto total libre de solvente.

Para todos los tiempos y temperaturas el E fue significativamente mayor que el rendimiento de FL (ANOVA, $p \leq 0,05$). Dado que el etanol puede extraer compuestos como hidratos de carbono, proteínas y fosfátidos (Chien y Joff, 1990), la diferencia entre E y FL puede atribuirse a estos compuestos. Baümler y col. (2016) obtuvieron hasta 9,98%bs de insolubles en n-hexano en collets de girasol por extracción en Soxhlet utilizando etanol (95%) como solvente, detectando que mayoritariamente estaban compuestos de azúcares y fosfolípidos. En secciones posteriores se estudia la composición de los extractos.

A su vez en las **Figuras 4-5, 4-6 y 4-7** se muestra la comparación de los rendimientos de FL obtenidos en esta sección y los rendimientos de aceite presentados en el Capítulo 3. Estos últimos fueron obtenidos utilizando el mismo pool de granos sin pretratamiento con microondas y extrayendo

el aceite en las mismas condiciones, pero utilizando n-hexano como solvente.

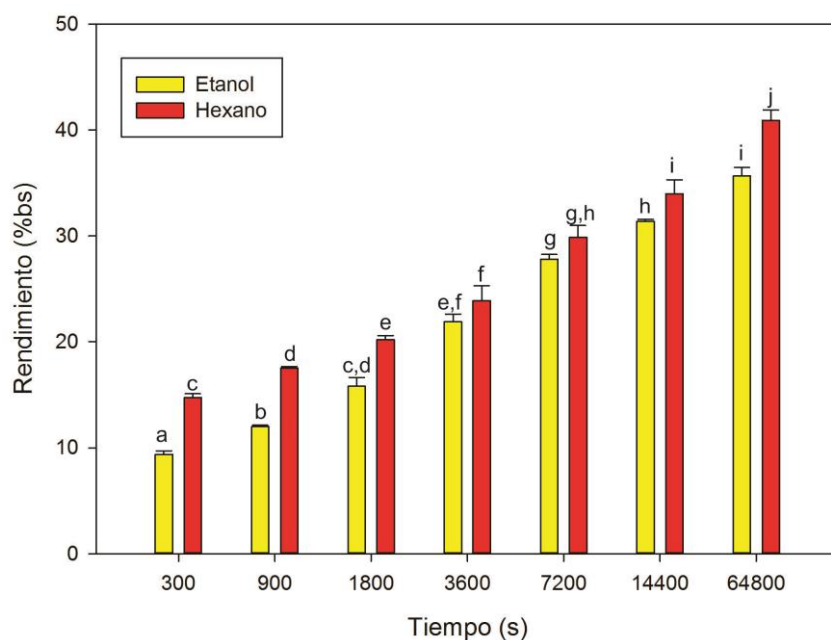


Figura 4-5. Rendimientos de aceite a 313 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. Solvente etanol: fracción de extracto soluble en n-hexano extraído con etanol (FL). Solvente n-hexano: aceite extraído con n-hexano. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$).

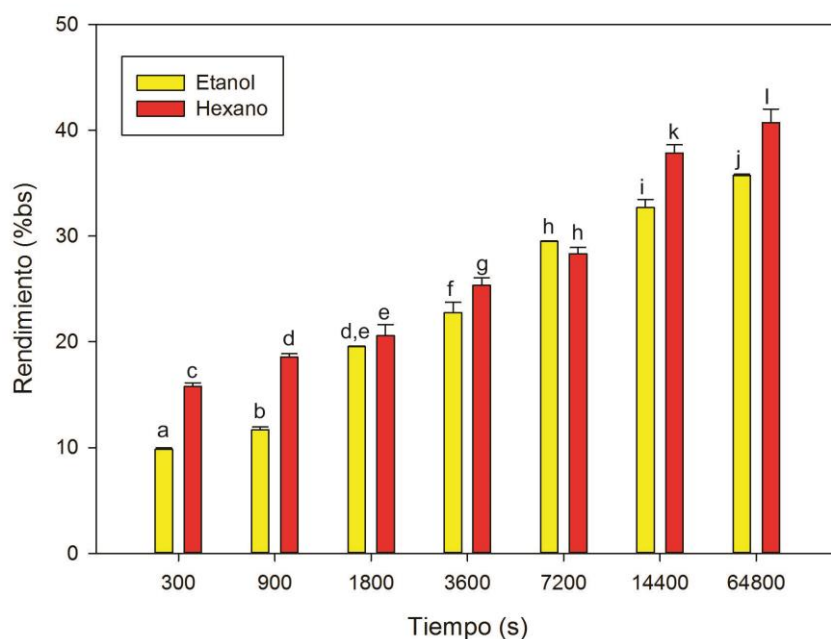


Figura 4-6. Rendimientos de aceite a 323 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. Solvente etanol: fracción de extracto soluble en n-hexano extraído con etanol (FL). Solvente n-hexano: aceite extraído con n-hexano. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$).

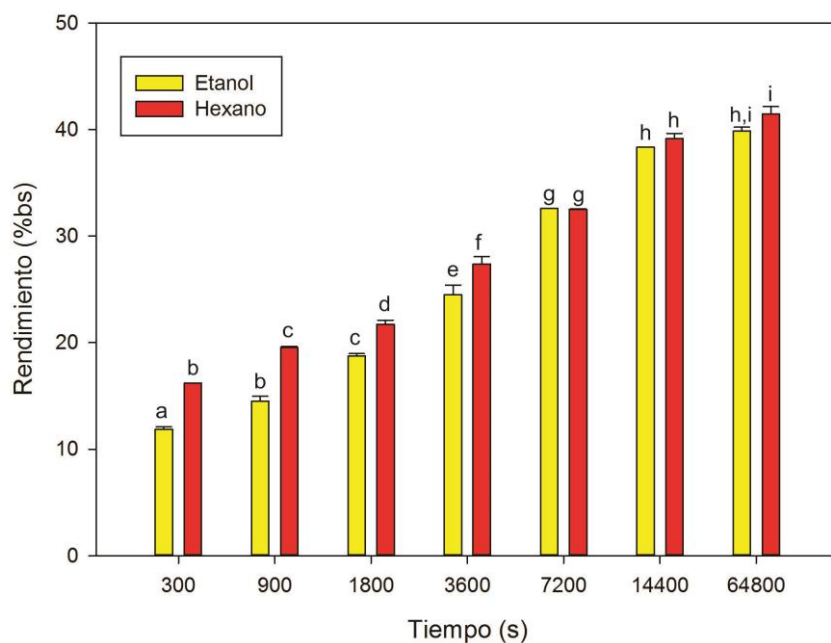


Figura 4-7. Rendimientos de aceite a 333 K y relación sólido:solvente 1:17, para granos de canola. Solvente etanol: fracción de extracto soluble en n-hexano extraído con etanol (FL). Solvente n-hexano: aceite extraído con n-hexano. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$).

A 313 y 323K de temperatura las extracciones de aceite con n-hexano fueron significativamente mayores que la fracción FL extraída con etanol para todos los tiempos con excepción de los obtenidos a 3600 y 7200 para la 313 K, y 1800 y 7200 s para 323 K, mientras que a 333K no se detectaron diferencias significativas a partir de los 7200 s.

4.2.2.2. Modelos de las respuestas E y FL para granos de canola sin pretratamiento con microondas

El análisis del estadístico F al comparar el modelo bidimensional para los rendimientos de E y FL mostró que se detectaron diferencias significativas ($F = 14,91$; $F_c = 2,79$) entre ellos. A su vez, el valor de ΔE para el modelo de E no fue significativo (t-test, $p > 0,05$) y no mostró dependencia con la temperatura en el rango de temperaturas estudiadas. Por lo tanto, se adoptó el modelo de difusión de Fick modificado para modelar la respuesta rendimientos de E considerando que tanto la M_0/M_∞ como D_{eff} son independientes de la temperatura en el rango analizado. Los resultados se presentan en la **Tabla 4-1**.

Tabla 4-1. Coeficientes del modelo de difusión de Fick modificado a temperatura constante ajustado para la respuesta E (Extracto total libre de solvente). Granos de canola sin pretratamiento con microondas. Solvente: etanol.

Parámetro	Valor	Valor de p
M_0/M_∞	$0,10 \pm 0,01$	$\leq 0,0001$
$D_{eff} \cdot 10^{12} (m^2/s)$	$1,3 \pm 0,1$	$\leq 0,0001$
R^2_{ajus}	0,990	
p del modelo	$< 0,0001$	

Con respecto a los rendimientos de FL, los resultados del ajuste del modelo global bidimensional se observan en la **Tabla 4-2** y **Figura 4-8**:

Tabla 4-2. Coeficientes del modelo de difusión de Fick modificado bidimensional ajustados para la respuesta FL (Fracción Lipídica).

Parámetro	Valor	Valor de p
M_0/M_∞	$0,17 \pm 0,02$	$\leq 0,0001$
$D_0 \cdot 10^{12} (\text{m}^2/\text{s})$	$1,6 \pm 0,1$	$\leq 0,0001$
$\Delta E (\text{kJ/mol})$	$15,0 \pm 4,8$	0,0059
R^2_{ajus}	0,990	
Modelo		$\leq 0,0001$

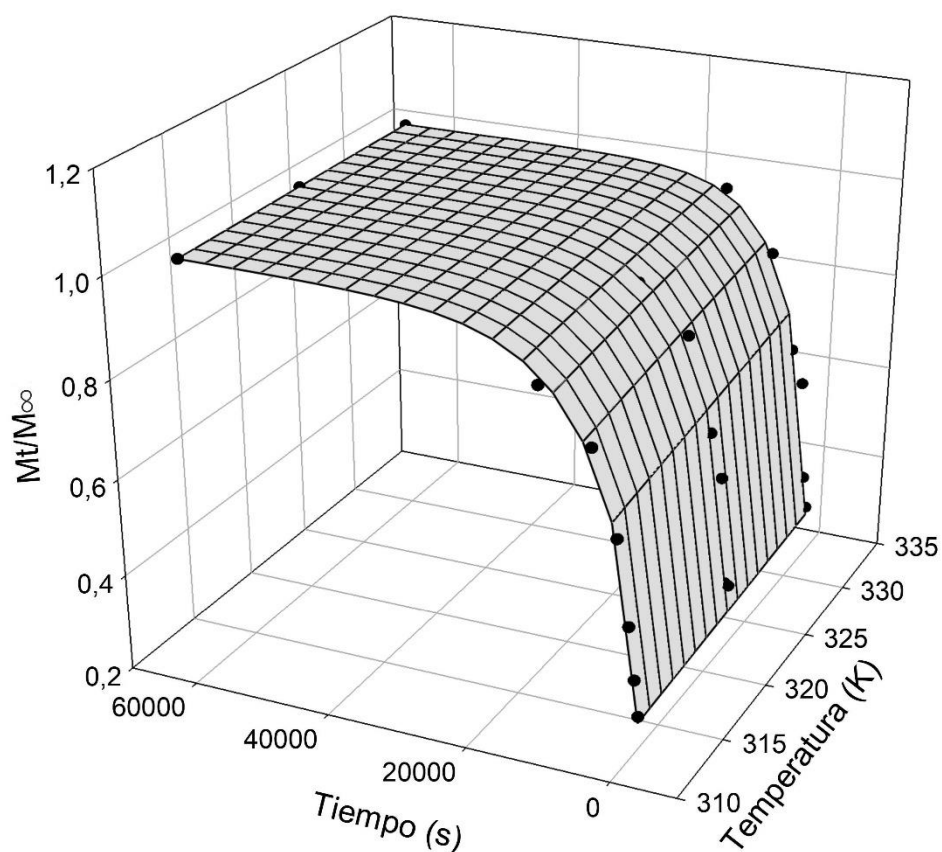


Figura 4-8. Rendimientos relativos de extracto soluble en n-hexano (FL) y superficie de ajuste ($R^2_{\text{ajus}} = 0,990$; $p \leq 0,0001$).

El análisis de R^2_{ajus} y p muestran el correcto ajuste del modelo a los datos experimentales. A su vez, la falta de ajuste analizada con el estadístico F confirma la significancia del ajuste ($F_0 = 2,33$; $F_c = 3,05$); asimismo, todos los parámetros fueron significativos ($p \leq 0,05$). La fracción de lavado M_0/M_∞ fue menor que la obtenida por extracción con n-hexano (0,24; Capítulo 3), indicando la dependencia de este parámetro con el solvente utilizado, siendo la difusión el fenómeno predominante en la extracción de etanol. Los valores D_0 y ΔE fueron inferiores a los encontrados para la extracción con n-hexano ($3,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ y $21,4 \text{ kJ/mol}$, respectivamente, Capítulo 3), mostrando la dependencia de ambos valores con el solvente.

En comparación con el n-hexano, el uso de etanol como disolvente influyó negativamente en el coeficiente pre exponencial, probablemente debido a la menor solubilidad del aceite en el etanol que en el n-hexano. Sin embargo, el etanol influyó positivamente en la extracción, disminuyendo el valor de la energía de activación, lo que puede atribuirse a un fenómeno diferencial en el mecanismo de extracción que permite aumentar la transferencia de masa (Fillion y col., 2012).

A su vez se obtuvieron D_{eff} al ajustar los datos con el modelo global a temperatura constante (ecuación 3.8 y 3.14), para todas las temperaturas el modelo a temperatura constante dio un $R^2_{\text{ajus}}=0,99$ y $p < 0,0001$. Los resultados se muestran en la **Tabla 4-3**:

Tabla 4-3. Coeficientes de difusión efectiva (D_{eff}) para la fracción lipídica (FL).

Parámetros	FL		
Temperatura (K)	313	323	333
$D_{\text{eff}} \cdot 10^{11} (\text{m}^2/\text{s})$	$9,2 \pm 0,8$	$10,8 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,2$

FL: Fracción de extracto soluble en n-hexano.

Los coeficientes de difusión obtenidos fueron un orden superior a los obtenidos para extracción con n-hexano ($1,1-1,3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$; Capítulo 3), mostrando una influencia del solvente utilizado en los parámetros cinéticos. Dado que los valores de D_{eff} fueron superiores a los obtenidos con n-hexano, se concluye que el efecto sobre la energía de activación predomina sobre el efecto sobre el coeficiente pre exponencial.

4.2.2.3. Pretratamiento con microondas

No se detectó un efecto significativo ($p > 0,05$) del pretratamiento con microondas en el rendimiento tanto para E como para FL para todos los tiempos a 333K y relación sólido:solvente 1:17, como se observa en las **Figuras 4-9 y 4-10**, por lo que no se realizó el estudio de la cinética de extracción para la muestra pretratada.

A su vez los rendimientos de FL obtenidos por extracción con etanol fueron similares a los obtenidos por extracción con n-hexano a partir de muestras pretratadas con microondas a partir de las 4 horas de extracción (Capítulo 3). A tiempos menores los rendimientos con etanol fueron menores lo que podría atribuirse a la diferencia de capacidad de extracción entre los solventes utilizados.

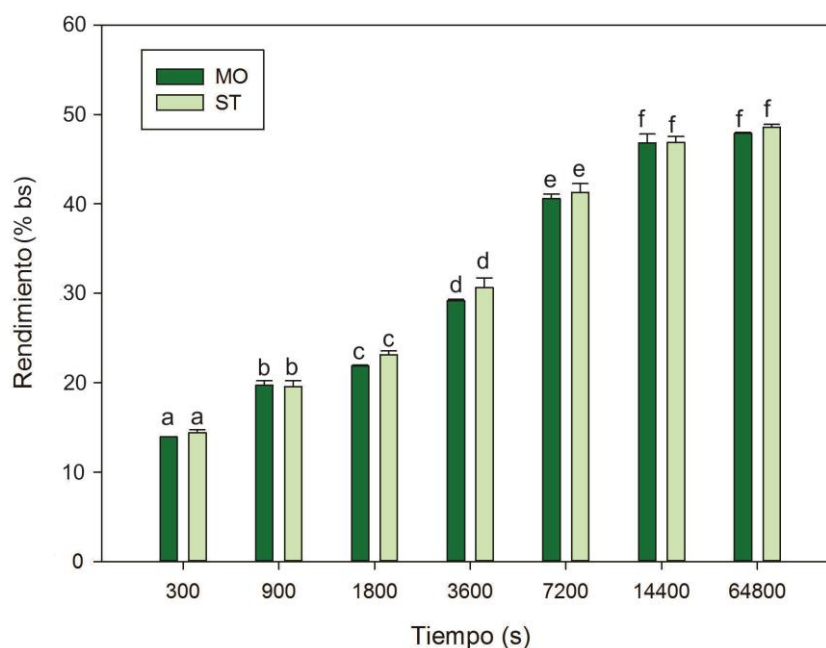


Figura 4-9. Rendimientos de extracción con etanol de extracto total libre de solvente (E) para muestras de granos de canola pretratadas con microondas y sin pretratar a 333 K y relación sólido:solvente 1:17. MO: muestra pretratada con microondas. ST: muestra sin pretratar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$).

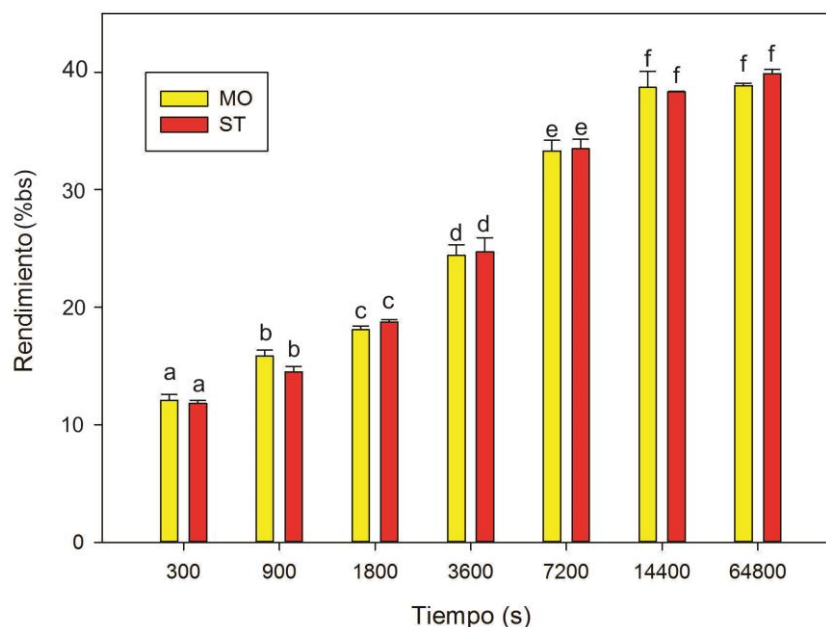


Figura 4-10. Rendimientos de extracción con etanol de fracción lipídica (FL) para muestras de granos de canola pretratadas con microondas y sin pretratar a 333 K y relación sólido:solvente 1:17. MO: muestra pretratada con microondas. ST: muestra sin pretratar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Test de Duncan, $p \leq 0,05$).

En función de los resultados obtenidos y con el fin de analizar el efecto del microondas, se consideró conveniente analizar el efecto de la relación sólido:solvente aumentando la cantidad de solvente, para dos tiempos de extracción y manteniendo las demás condiciones operativas de la sección 4.2.1. (dispositivo batch agitado, Temperatura 333K) En la **Tabla 4-4** se comparan los rendimientos de extracción de aceite para muestras pretratadas con microondas y sin pretratar utilizando n-hexano con una relación muestra solvente de 1:17 y los rendimientos de FL utilizando etanol con relaciones 1:17 y 1:34. En ambos casos para dos tiempos de extracción.

Tabla 4-4. Rendimientos de extracción de aceite y/o FL (%bs) de granos de canola procesados de formas diferentes (muestras), empleando dos relaciones sólido:líquido a 333K.

Relación sólido:solvente	Muestra (Pretratamiento-Solvente)	Tiempo (s)	
		3600	14400
1:17	Sin pretratar – n-hexano*	27,4 ^a ±0,7	39,2 ^a ±0,5
	Microondas-n-hexano*	34,9 ^b ±0,5	40,1 ^a ±0,6
	Sin pretratar – Etanol	24,5 ^a ±0,9	38,3 ^a ±0,1
	Microondas - Etanol	24,4 ^a ±0,9	38,7 ^a ±1,4
1:34	Sin pretratar – Etanol	35,8 ^b ±1,3	38,7 ^a ±0,7
	Microondas - Etanol	35,5 ^b ±1,4	38,8 ^a ±0,5

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

* Datos extraídos del Capítulo 3.

Para ambas relaciones de sólido:solvente utilizando etanol no se detectó un efecto del pretratamiento con microondas sobre el rendimiento de FL. A 14400 s no se detectaron diferencias significativas entre ningún experimento analizado. El valor obtenido corresponde al máximo extracto obtenible para el grano y sistema utilizado. A los 3600 s el rendimiento

para la relación 1:34 empleando etanol no fue significativamente diferente al obtenido utilizando n-hexano sobre muestras pretratadas con microondas, y éstos a su vez fueron superiores a los rendimientos obtenidos utilizando n-hexano en muestras sin pretratar y empleando etanol con una relación 1:17; mostrando que para extracciones con etanol la disminución de la relación sólido:solvente para relaciones inferiores a 1:17 puede incrementar la velocidad de extracción. Este comportamiento podría atribuirse a un cambio en la fuerza impulsora, así como de los coeficientes de transferencia de masa debido a una disminución en la viscosidad de la miscela (Pérez, 2001). A partir de los resultados obtenidos, se destaca que la utilización de una adecuada relación de sólido:solvente para la extracción con etanol puede permitir obtener rendimientos equivalentes a los obtenidos con n-hexano sobre muestras pretratadas con microondas, sin la necesidad de aplicar un pretratamiento con microondas. Cabe destacar que se registraron mayores rendimientos de E para ambos tiempos ($44,3 \pm 1,4\%$ bs a los 3600 s y $49,1 \pm 0,1\%$ bs a 14400 s), al disminuir la relación sólido:solvente; sin detectarse diferencias significativas en E por efecto del pretratamiento con microondas.

4.2.2.4. Micrografías electrónicas de barrido de granos molidos pre y pos extracción

En la **Figura 4-11** se observan micrografías electrónicas de barrido (SEM) de granos molidos antes y con posterioridad a la extracción de aceite con distintos solventes (n-hexano y etanol).

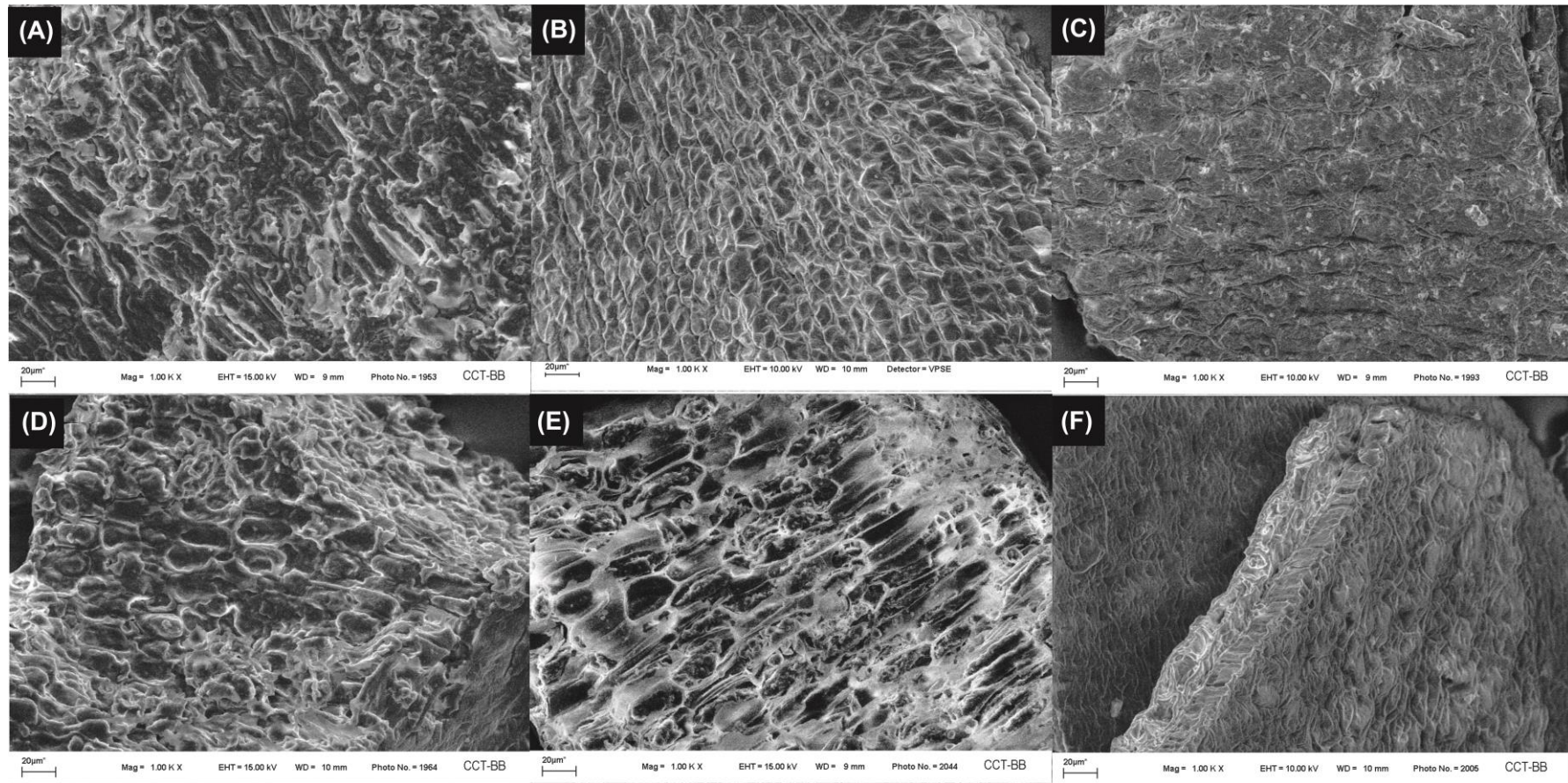


Figura 4-11. Micrografías electrónicas de barrido de granos de canola molidos. (A) Granos molidos. (B) Granos molidos y extraídos con n-hexano. (C) Granos molidos extraídos con etanol. (D) Granos pretratados con microondas y molidos. (E) Granos pretratados con microondas, molidos y extraídos con n-hexano. (F) Granos pretratados con microondas, molidos y extraídos con etanol.

En el caso de las muestras pre extracción (**Figure 4-11-A y D**) se observa una matriz estructural definida siendo más compacta en la muestra sin pretratar, en la **Figura 4-11-E** se una estructura más abierta que en la **Figura 4-11-B** y con mayor claridad que en las **Figuras 4-11-A y D** por la extracción del aceite con n-hexano; sin embargo en las muestras post extracción con etanol (**Figuras 4-11-C y E**) se observa una pérdida de integridad de las estructuras por efecto del etanol, a diferencia de lo visto en las muestras post extracción con n-hexano.

Los solventes hidrofóbicos como el n-hexano presentan dificultades para extraer el aceite de cuerpos grasos cubiertos de sus membranas (Huang, 1992), siendo necesario pretratamientos térmicos y/o mecánicos que permitan romper la micro estructura del grano y los cuerpos grasos. Ramos y col., (2017) reportaron un aumento de los rendimientos de extracción con n-hexano por efecto del microondas, atribuido a la rotura de las estructuras celulares y aumento de porosidad, permitiendo mayor accesibilidad al aceite por parte del solvente; el mismo comportamiento se observó en el capítulo 3 de esta tesis. Sin embargo, el etanol es un solvente polar capaz de disolver compuestos como fosfátidos, carbohidratos y estructura de oleosinas con aminoácidos polares como la prolina, los cuales forman parte de las membranas de las células vegetales y particularmente las que cubren los cuerpos grasos (Huang, 1992); por lo que en la extracción de aceite por parte del etanol podría predominar un fenómeno de disolución parcial de las estructuras como se observó en las imágenes SEM, facilitando la accesibilidad

al aceite por parte del solvente, independientemente del rompimiento de las estructuras por efecto del pretratamiento con microondas.

Cabe destacar que en futuros estudios sería necesario optimizar la relación sólido:solvente a utilizar realizando el estudio de la cinética a dicha relación.

4.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR SEPARACIÓN DE FASES (LIBRE DE HEXANO)

4.3.1. Materiales y métodos

4.3.1.1. Pretratamiento con microondas

Se utilizaron granos de canola pretratados con microondas según la metodología descrita en la sección 2.2.2.2 y sin pretratar.

4.3.1.2. Extracciones

Para cada extracción (muestras pretratadas con microondas y sin pretratar) se molieron 20 g de granos de canola y se pusieron en contacto con 340 mL de etanol 99% en un sistema batch agitado (agitador magnético) con un baño termostáticamente controlado a una temperatura constante de 60 °C durante 14400 segundos, condiciones en las que se obtiene la mayor cantidad de FL determinadas previamente en la sección 4.2.2.3. Transcurrido el tiempo preestablecido, se centrifugó el contenido en un equipo refrigerado Presvac MSP-4650 R Plus (Argentina) durante 5 minutos a 5438 G. Posteriormente se filtró el contenido y la micela se recogió en un balón (Et), el aceite se obtuvo siguiendo dos métodos diferentes.

4.3.1.3. Obtención de aceite

En la **Figura 4-12** se muestra el esquema de los distintos procesos (P1 y P2) aplicados para la obtención del aceite. P1 implica una etapa de lavado de n-hexano como se describe en la sección 4.2.1.2 para realizar una comparación de control con P2, que es el proceso libre de n-hexano. El método P2, consistió en la evaporación parcial del solvente (hasta una relación aproximada de 4:1 solvente:aceite) del extracto total (Et), con la consecuente generación de tres fases: una fase rica en aceite (FL+Etanol), una fase rica en solvente (EtF+Etanol) y una fase sólida (FS) como se muestra en la **Figura 4-13**. El extracto concentrado (las 3 fases) fue enfriado a 6°C y centrifugado a 5438 G durante 15 minutos. Posteriormente las tres fases generadas fueron separadas en una ampolla de decantación de 100 mL y recogidas en balones separados. Luego se evaporó el etanol de cada fase, obteniendo separadamente una fracción soluble en n-hexano (Fracción lipídica, FL) y solubles en la fase rica en etanol (EtF). Cabe destacar que se constató la total solubilidad de FL en n-hexano.

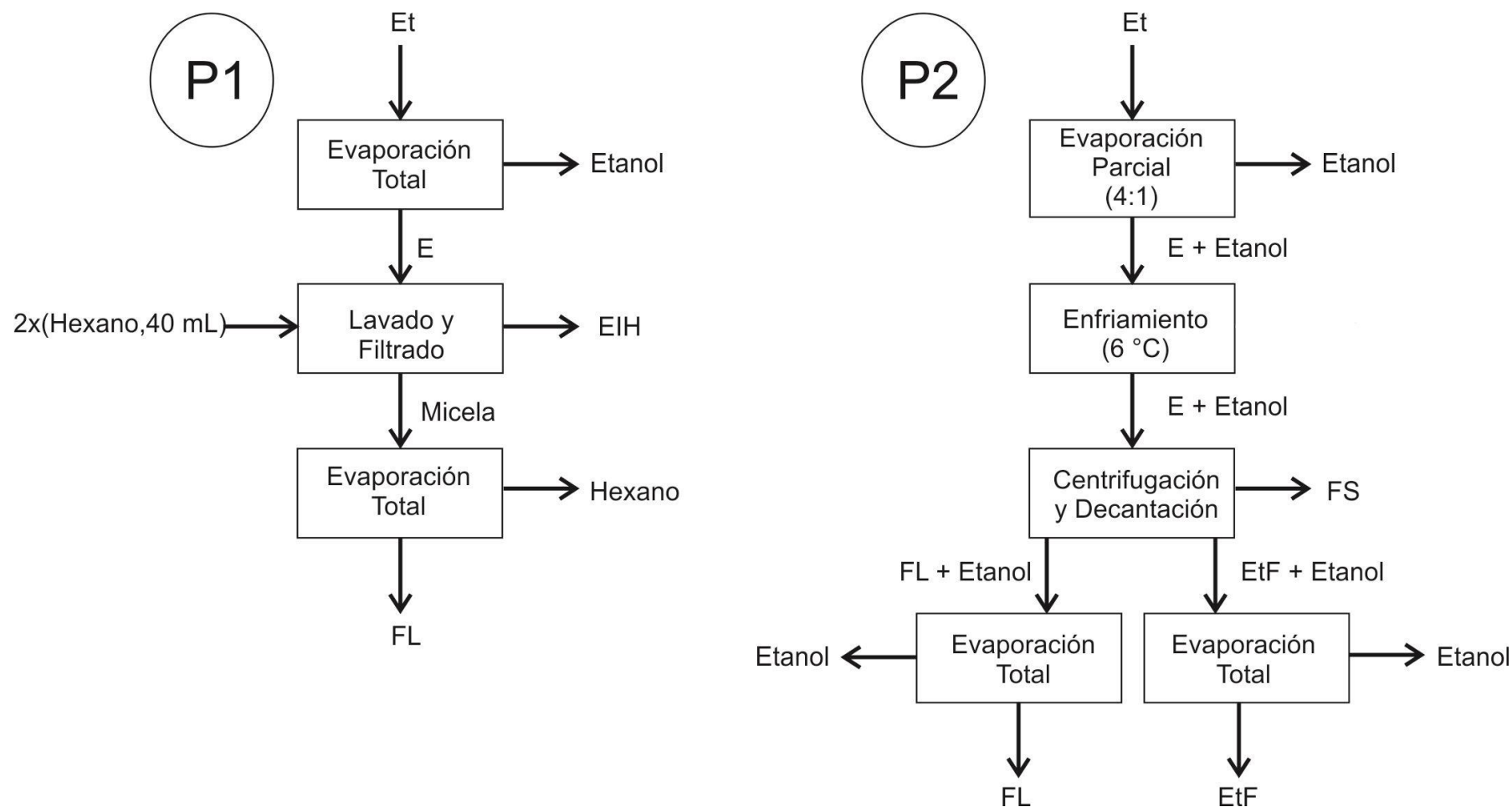


Figura 4-12. Esquema de los procesos aplicados para la obtención de aceite. P1: Proceso 1: lavado con n-hexano. P2: Proceso 2: separación de fases. Et: extracto total. E: extracto total libre de solvente. EIH: fracción de extracto insoluble en n-hexano para el P1. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano para el P1 y P2. FS: fase sólida obtenida por el P2. EtF: solubles en la fase rica en etanol.

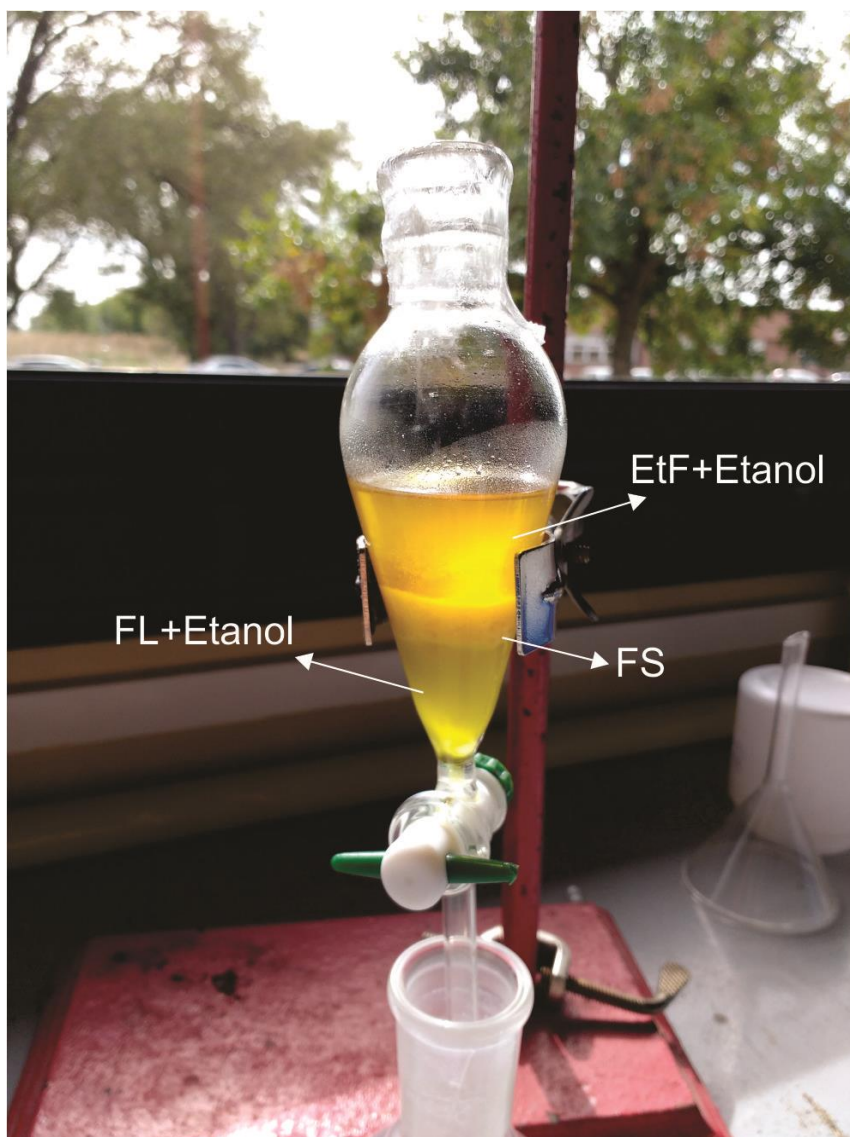


Figura 4-13. Fases generadas mediante la aplicación del proceso P2 para la obtención de aceite. FL+Etanol: Fase rica en aceite. FS: Fase sólida. EtF+Etanol: Fase rica en solvente.

A su vez, se realizó un fraccionamiento con n-hexano de la EtF para determinar el contenido de solubles en n-hexano (SH-EtF). Se adicionaron 10 mL de n-hexano a la EtF, luego se sometió a agitación, filtrado y posteriormente la micela se evaporó.

La cuantificación de todas las fracciones se realizó gravimétricamente.

El proceso completo para obtener el aceite (extracción y separación de insolubles en aceite) se llevó a cabo por duplicado tanto para P1 como para P2.

4.3.1.4. Determinación del contenido de carbohidratos totales

Se determinó el contenido de carbohidratos totales de las fracciones insolubles en n-hexano mediante el método de fenol-sulfúrico descrito por DuBois y col. (1956).

La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos solubles por espectrofotometría se basa en la utilización del método colorimétrico de fenol-sulfúrico que depende de la conversión de carbohidratos a derivados del furfural que transcurre en el proceso de reacción. Los derivados del furfural con las formas del fenol coloreado absorben la luz en el rango visible a una longitud de onda de 490 nm.

Se colocan 0,01 g de muestra en 1000 mL de agua, se toma 1 mL y se le adiciona 1 mL de solución acuosa al 5% de fenol en un tubo de ensayo. Posteriormente, se añade 5 mL de ácido sulfúrico concentrado rápidamente a la mezcla. Luego el tubo de ensayo se deja en reposo durante 10 min, se agita durante 30 segundos y se coloca durante 20 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente para el desarrollo de color. El blanco y la solución patrón se preparan conforme al procedimiento anteriormente descrito, utilizando glucosa.

Finalmente se lleva a una cubeta donde se deposita en el espectrofotómetro con una longitud de onda a 490 nm y se procede a leer la absorbancia

utilizando un Espectrofotómetro Mapada UV 1800 PC (China). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Preparación de la curva patrón

Para leer los resultados de la muestra a analizar, es necesario construir una curva de calibración a diferentes concentraciones con un carbohidrato de referencia.

Se procede a determinar las diferentes concentraciones tomando glucosa como carbohidrato de referencia partiendo de 0,01% que indica 0,1 g en 1000 mL de agua. Posteriormente se toman alícuotas de 0,1; 0,2; 0,3 y se completa a volumen para 1 mL con agua destilada. Por último se añade el fenol y el ácido sulfúrico siguiendo la metodología anterior, para ser leídas en el espectrofotómetro. Para calibrar el espectrofotómetro se procede a ubicar el blanco que se tiene provisto en la celda, ajustándolo al 100% de transmitancia y 0,00 de absorbancia. La ecuación de linealidad que arroje la grafica de la curva patrón se tomara como referencia para hallar matemáticamente la concentración del azúcar presente en la muestra. Los resultados de la calibración se muestran en la **Tabla 4-5**.

Tabla 4-5. Rectas de calibración de glucosa.

Concentración (C) ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (A)	Recta de calibración
0,00	0,000	$C = 79,49 \cdot A$ $R^2 = 0,99$
10,00	0,183	
40,00	0,530	
70,00	0,851	

Cálculos

El contenido de carbohidratos de la fracción, expresado en base a la muestra de extracción (%bs) se calculó mediante la ecuación (4.1):

$$CH = [C] \cdot \frac{V}{m} \cdot F \quad (4.1)$$

Donde:

CH: cantidad de carbohidratos en la fracción insoluble en n-hexano expresada en base a la muestra de extracción (%bs).

[C]: concentración de carbohidratos en $\mu\text{g/mL}$ calculado a partir de la recta de calibrado.

V: volumen de la muestra en mL.

m: peso de la muestra tomada de la fracción correspondiente para la medición en g.

F: rendimiento de la fracción insoluble en n-hexano (%bs).

4.3.1.5. Análisis estadístico

A los fines de detectar diferencias en los valores observados se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Tukey considerándose que las medias eran significativamente diferentes si $p \leq 0,05$ utilizando el software Infostat (Di Rienzo y col., 2012).

4.3.2. Resultados y discusión

En la **Tabla 4-6** se muestran los rendimientos (expresados en porcentaje base seca y respecto a la muestra original,%bs) obtenidos de las distintas fracciones empleando los métodos P1 y P2.

Tabla 4-6. Rendimiento de las fracciones obtenidas por los procesos P1 y P2 (extracción con etanol), para granos de canola pretratados con microondas (Microondas) y sin pretratar, y de aceite obtenido con n-hexano (granos sin pretratamiento con microondas).

Fracción (%bs)	Etanol				n-hexano
	Sin pretratar		Microondas		Sin pretratar
	P1	P2	P1	P2	
FL	41,7 ^b ±0,8	32,4 ^a ±0,2	42,4 ^b ±1,1	33,1 ^a ±1,3	39,1 ^b ±0,8
EIH	4,7 ^a ±0,2		4,3 ^a ±1,4		
CH	3,1 ^a ±0,2		3,9 ^a ±0,2		
FS		4,5 ^a ±0,2		4,0 ^a ±0,2	
CH		0,7 ^a ±0,1		0,6 ^a ±0,1	
EtF		8,0 ^a ±0,7		7,4 ^a ±0,7	
CH		2,3 ^a ±0,3		1,8 ^a ±0,2	
SH		5,0 ^a ±0,1		5,1 ^a ±0,3	

P1: Proceso 1: lavado con n-hexano; P2: Proceso 2: separación de fases. N-hexano: extracción con N-hexano. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. EIH: fracción de extracto insoluble en n-hexano para P1. FS: fase sólida obtenida por P2. EtF: solubles en la fase rica en etanol obtenida por P2. CH: contenido de carbohidratos de las fracciones EIH para P1, FS y EtF para P2 expresado en base a la muestra de extracción. SH: solubles en n-hexano de la fase EtF. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

Tanto con el P1 como con el P2 y para todas las fracciones obtenidas no se observó efecto significativo del pretratamiento de los granos con microondas ($p > 0,05$). Ramos y col. (2017) no detectaron diferencias significativas a partir de las 4 horas de extracción por Soxhlet con n-hexano en los rendimientos de aceite entre granos pretratados con microondas y sin pretratar, el mismo comportamiento se observó en el proceso de extracción con etanol.

En todas las fracciones analizadas (EIH, FS, EtF) se observa la presencia de carbohidratos. El etanol puede extraer compuestos como hidratos de carbono y proteínas (Chien y Joff, 1990) entre otros, Baümler y col. (2016) obtuvieron 9,98% bs de insolubles en n-hexano, a partir de collets de girasol procesados por extracción en Soxhlet utilizando etanol (95%) como solvente, detectando que mayoritariamente se componían de azúcares y fosfolípidos.

No se detectó efecto significativo del microondas en el contenido de carbohidratos totales para ninguna fracción. Se observa que mayor cantidad de carbohidratos de los granos se encuentran en las fracciones EtF con respecto a las fracciones FS; mostrando que la mayor parte de los carbohidratos extraídos presentan una elevada solubilidad en etanol. Se observó un bajo contenido de carbohidratos en las fracciones precipitadas (FS), sugiriendo que la diferencia registrada entre el total de solubles en n-hexano obtenidos con P2 y el total de solubles en n-hexano obtenidos con P1 ($4,2 \pm 1,9\%$ bs), una significativa retención de aceite en estas fracciones.

En el caso de P2, los rendimientos de FL fueron significativamente menores a los obtenidos con P1 (promedio de la diferencias de $9,3 \pm 1,7\%$ bs), sin embargo FL y los solubles en n-hexano de la fracción EtF obtenidos con P2 (FL+SH de EtF promedio, $37,8 \pm 0,9\%$ bs) presentó una diferencia promedio de $4,2 \pm 1,9\%$ bs puntos con respecto al rendimiento de FL obtenido con P1. Cabe destacar que se observó una fracción sólida insoluble en aceite (aproximadamente 25% de FL; cuantificado gravimétricamente) pero soluble en n-hexano en las fracciones FL obtenidas con P1, la cual no es detectada en el aceite extraído del grano con n-hexano (Capítulo 2). Esta fracción sólida insoluble podría atribuirse a fosfolípidos y otros lípidos minoritarios con funciones estructurales en los cuerpos grasos y en otras organelas de las células vegetales, los cuales podrían ser extraídos por el etanol (compuesto polar) pero no por solventes no polares como el n-hexano. Sin embargo, una vez disueltas las estructuras conformadas por estos compuestos, los mismos podrían solubilizarse en n-hexano. Por su parte, no se observó la presencia de estos compuestos en la FL obtenida con P2, los mismos podrían encontrarse

incluidos en la EtF. En concordancia con lo observado en este trabajo, Yatsu y Jacks (1972) al realizar la extracción de aceite con n-hexano de cuerpos grasos aislados observaron por micrografía electrónica que las membranas no fueron extraídas por el n-hexano. A su vez Tzen y Huang (1992) separaron el material interfacial de cuerpos grasos extrayendo el aceite con dietil éter y disolviendo dicho material interfacial (proteínas, fosfolípidos, glicolípidos, etc.) con mezclas de cloroformo y metanol (compuestos polares). Se observó que la fracción soluble en n-hexano de EtF (SH-EtF) libre de solvente, se encuentra en estado sólido, lo que es consistente con lo planteado anteriormente.

4.4. ANÁLISIS DE CALIDAD DE LAS FRACCIONES FL y SH-EtF

Para las fracciones FL y SH-EtF obtenidas con los procesos P1 y P2 se realizaron ensayos de calidad para caracterizar las mismas.

4.4.1. Materiales y métodos

4.4.1.1. Índices de calidad

Las fracciones lipídicas se caracterizaron mediante la composición acídica, el valor de acidez, índice de peróxido (*IP*), valor de p-anisidina (*pVA*) e índice de productos totales de oxidación (*Totox*) como se describió en el Capítulo 2.

4.4.1.2. Determinación del contenido de tocoferoles y canolol

Se determinó el contenido de canolol y composición de tocoferoles para todas las fracciones lipídicas obtenidas siguiendo la técnica descrita en la sección 2.2.3.1. Cabe destacar que para la toma de muestra en el caso de fracciones heterogéneas (líquidos y sólidos) las mismas se disolvieron en n-hexano, se

tomaron alícuotas en matraces de 25 mL y se evaporó el n-hexano bajo corriente de nitrógeno hasta obtener aproximadamente 0,15 g de muestra.

4.4.2. Resultados y discusión

4.4.2.1. Composición de ácidos grasos

En las **Tablas 4-7** se muestra la composición de ácidos grasos de las fracciones solubles en n-hexano (FL).

Tabla 4-7. Composición de ácidos grasos de las fracciones solubles en n-hexano (FL) obtenidas por los procesos P1 y P2 (muestras de granos de canola pretratadas con microondas y sin pretratar) y por extracción con n-hexano.

Solv.	Proceso		Acido graso (% del total de ácidos grasos)				
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Etanol	Sin pretratar	P1	4,5 ^a ±0,4	2,0 ^a ±0,1	66,6 ^a ±6,1	18,8 ^a ±0,4	8,1 ^a ±0,6
		P2	4,9 ^a ±0,4	1,8 ^a ±0,1	66,7 ^a ±6,1	18,6 ^a ±0,4	8,0 ^a ±0,6
	Microondas	P1	5,0 ^a ±0,4	2,0 ^a ±0,1	66,8 ^a ±6,1	18,4 ^a ±0,4	7,9 ^a ±0,5
		P2	5,2 ^a ±0,5	1,9 ^a ±0,1	66,6 ^a ±6,1	18,4 ^a ±0,4	7,9 ^a ±0,6
n-hexano	Sin pretratar		5,6 ^a ±0,5	1,7 ^a ±0,1	65,7 ^a ±6,0	19,0 ^a ±0,4	7,9 ^a ±0,6

Sol.: Solvente. P1: Proceso 1, P2: Proceso 2. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$). C16:0, ácido palmítico; C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oleico; C18:2, ácido linoleico; C18:3, ácido linolénico.

No se detectaron diferencias en la composición de ácidos grasos para las muestras extraídas con etanol (Proceso 1 y Proceso 2, con y sin pretratamiento con microondas de los granos) y la extraída con n-hexano; indicando que no se detecta un efecto del solvente de extracción ni de el proceso de obtención del aceite en la composición acídica del mismo.

4.4.2.2. Contenido de tocoferoles y canolol

En la **Tabla 4-8** se informa el contenido de tocoferoles y canolol de las fracciones solubles en n-hexano (FL y SH-EtF) obtenidas por los procesos P1 y P2. Con respecto al contenido de tocoferoles totales (CTT) no se detectó efecto

significativo del pretratamiento de los granos con microondas, resultados similares a los reportados en el Capítulo 2 y a los reportados por Ramos y col. (2017) para aceites de canola extraídos de granos pretratados con microondas utilizando n-hexano como solvente.

A su vez se observó que el contenido de CTT en las FL obtenidas con P1 fue mayor al de los obtenidos con P2, pero no se diferenció significativamente al del aceite obtenido con n-hexano, mostrando una independencia del tipo de solvente en la extracción de tocoferoles.

Generalmente se observa el mismo comportamiento para los distintos isómeros del tocoferol. Comparando los datos de la **Tabla 4-8** las fracciones SH-EtF presentaron un aumento de hasta 467% en el contenido de tocoferoles totales con respecto a los FL de P2, indicando una concentración de estos compuestos en las fases SH-EtF.

Tabla 4-8. Contenido de tocoferoles y canolol de las fracciones de extracto soluble en n-hexano (FL y SH-EtF) obtenidas por los procesos P1 y P2 (pretratadas con microondas y sin pretratar) y aceite extraído con n-hexano.

Compuestos (µg/g)	Etanol						n-hexano
	Sin pretratar			Microondas			Sin pretratar
	P1	P2		P1	P2		
	FL	FL	SH-EtF	FL	FL	SH-EtF	Aceite
α-TC	221,3 ^b ±3,7	152,1 ^a ±13,3	739,5 ^d ±7,1	226,3 ^b ±5,7	137,4 ^a ±5,0	747,4 ^d ±14,8	301,4 ^c ±5,5
β-TC	44,0 ^b ±0,1	55,7 ^c ±3,7	87,3 ^d ±1,6	33,7 ^a ±2,5	50,0 ^{b,c} ±3,1	89,9 ^d ±1,8	31,2 ^a ±0,6
γ-TC	371,8 ^b ±0,9	227,4 ^a ±11,5	1317,8 ^d ±7,9	424,7 ^c ±6,5	208,3 ^a ±10,7	1384,6 ^d ±20,3	445,6 ^c ±4,7
δ-TC	13,1 ^a ±1,8	7,8 ^a ±0,4	20,9 ^{a,b} ±20,0	24,3 ^b ±6,3	7,6 ^a ±6,3	63,1 ^b ±17,0	1,9 ^a ±0,2
CTT	650,3 ^b ±6,4	442,9 ^a ±29,6	2165,6 ^d ±36,7	708,9 ^{b,c} ±8,4	403,2 ^a ±25,1	2285,0 ^d ±20,7	780,2 ^c ±9,4
canolol	15,8 ^c ±0,1	3,7 ^a ±0,2	95,5 ^e ±5,6	65,9 ^d ±0,4	11,0 ^b ±0,4	293,1 ^f ±7,6	10,8 ^b ±0,1

P1: Proceso 1. P2: Proceso 2. FL: fracción de extracto soluble en n-hexano. SH-EtF: fracción soluble en n-hexano de los solubles en la fase rica en etanol. α-TC: Alfa tocoferol. β-TC: Beta tocoferol. γ-TC: Gama tocoferol. δ-TC: Delta tocoferol. CTT: Tocoferoles totales. El contenido de tocoferoles se expresan en µg tocoferol/g, FL, SH-EtF o Aceite, según corresponda. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, p≤0,05).

Estos resultados muestran que durante la formación de dos fases en el proceso P2 parte de los tocoferoles totales extraídos quedan en la fase rica en etanol.

Con respecto al canolol se observa un incremento por efecto del microondas de hasta 317%, indicando la producción de este compuesto por efecto de la radiación con microondas (Spielmeyer y col., 2009) y un aumento de 2564% en las fases SH-EthF con respecto a las FL de P2, observándose una concentración del mismo. Estos resultados muestran que se obtuvo un subproducto rico en antioxidantes, conteniendo entre 53 y 71% del canolol de FL obtenido por P1. Kraljić y col. (2015) reportaron que más del 90% del canolol se elimina durante la etapa de refinación del aceite crudo, siendo necesario optimizar los procesos de refinación para aumentar la concentración de canolol en los aceites comestibles de canola; por lo tanto, el P2 propuesto permitiría recuperar este valioso componente antes de la etapa de refinación en un proceso industrial.

El contenido de canolol de la FL obtenida con P1 de la muestra sin pretratar fue significativamente superior al del aceite obtenido en la extracción con n-hexano, indicando una mayor capacidad de extracción de este compuesto por parte del etanol con respecto al n-hexano.

4.4.2.3. Valores de acidez, peróxidos, p-anisidina y Totox

En la **Tabla 4-9** se muestran los valores de acidez (VA), índice de peróxidos (IP), valor de p-anisidina (pVA) y valor de Totox de las FL obtenidas con etanol y aceite obtenido con n-hexano.

Si bien se detectaron diferencias significativas en los VA, todos los valores fueron inferiores a los límites permitidos para aceites vírgenes (4,0 mgKOH/g aceite, Codex Alimentarius, 2015).

Se observaron índices de peróxidos (IP) significativamente menores en las muestras pretratadas con respecto a las sin pretratar, sin embargo los IP de los FL de P2 fueron mayores que los de P1, y no fue detectado en el aceite extraído con n-hexano. Todos los valores fueron menores al límite máximo establecido para aceites vírgenes (15 meq O₂/kg aceite, Codex Alimentarius, 2015).

Tabla 4-9. Índices de calidad de las fracciones de extracto solubles en n-hexano (FL) obtenidas por los procesos P1 y P2, y aceite obtenido con n-hexano.

Índices de calidad	Etanol				n-hexano
	Sin pretratar		Microondas		Sin pretratar
	P1	P2	P1	P2	
VA (mgKOH/g)	1,76 ^d ±0,01	0,71 ^a ±0,02	1,61 ^c ±0,05	0,72 ^a ±0,01	1,09 ^b ±0,03
IP (meqO ₂ /kg)	7,0 ^c ±0,1	10,9 ^d ±0,1	3,2 ^a ±0,1	6,1 ^b ±0,1	ND
pAV	9,4 ^d ±0,6	4,4 ^b ±0,1	6,6 ^c ±0,1	3,1 ^a ±0,1	2,0 ^a ±0,1
Totox	23,4 ^d ±0,6	26,2 ^e ±0,1	12,9 ^b ±0,1	15,4 ^c ±0,1	2,0 ^a ±0,1

P1: Proceso 1, P2: Proceso 2. VA: valor de acidez. IP: Índice de Peróxidos. pAV: Índice de p-anisidina. Totox: Índice de productos totales de oxidación. ND: No detectado. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, p≤0,05).

Los valores de p-anisidina (pAV) mostraron el mismo comportamiento que los valores de IP con respecto al efecto del microondas, sin embargo al comparar los FL el comportamiento de pAV resultó inverso al de IP. Por otro lado, el pAV del aceite extraído con n-hexano no fue

significativamente distinto al obtenido para el FL de P2 obtenido de granos pretratados con microondas. Dado que el *IP* es un indicador de los productos de oxidación primarios mientras que el *pAV* analiza los productos de oxidación secundarios, se evaluaron los productos totales de oxidación mediante el cálculo del índice *Totox*, con el fin de analizar el efecto del microondas y el proceso de extracción aplicado. Con respecto al microondas se observó el mismo comportamiento que los índices de calidad analizados previamente (menor *Totox* debido al pretratamiento), mientras que las diferencias en los valores de los FL de P2 con respecto a los de P1 disminuyeron siguiendo la tendencia del *IP*. Por su parte la muestra extraída con n-hexano registró el menor valor de *Totox* el cual fue coincidente con el valor de p-anisidina. El disímil comportamiento de los índices de *IP*, *pAV* y *Totox* entre las fracciones obtenidas con los P1 y P2 podría deberse a una heterogeneidad en la distribución de compuestos de oxidación entre las fases resultantes (FL y EtF) durante el proceso de separación de fases en P2, modificándose los valores de *IP*, *pAV* y *Totox* de los FL de P2 con respecto a los de P1.

A su vez, las diferencias entre los valores de *IP*, *pAV* y *Totox* en las muestras pretratadas con microondas con respecto a las sin tratar puede atribuirse a un efecto de protección antioxidante del canolol, el cual es descrito como un potente y efectivo antioxidante en la literatura (Koski y col., 2003; Kuwahara y col., 2004; Vuorela y col., 2005; Wakamatsu y col., 2005).

4.5. CONCLUSIONES PARCIALES

La extracción con etanol permitió obtener un extracto total (E) el cual se compone de una fracción soluble en n-hexano (FL) y una fracción insoluble en n-hexano. Para muestras sin pretratar, los rendimientos de FL a 333 K (relación sólido:solvente 1:17) y a partir de los 7200 s de extracción, no fueron significativamente diferentes a los obtenidos con n-hexano; a tiempos y temperaturas inferiores generalmente los rendimientos obtenidos con n-hexano fueron superiores a los obtenidos con etanol. Se adoptó un modelo de difusión de Fick modificado bidimensional ($R^2_{\text{ajus}} = 0,990$) para ajustar los rendimientos de extracción de FL, sin embargo para los rendimientos de E se optó por el modelo de difusión de Fick modificado con fracción de lavado (M_0/M_∞) y coeficiente de difusión efectiva (D_{eff}) independiente de la temperatura en el rango estudiado ($R^2_{\text{ajus}} = 0,990$). Con respecto a la cinética de extracción de FL, la fracción de lavado M_0/M_∞ presentó un valor de (0,03) inferior al obtenido mediante extracción con n-hexano, sin embargo los coeficientes de difusión obtenidos fueron un orden superior a los obtenidos para extracción con n-hexano, siendo la difusión el fenómeno predominante en la extracción con etanol y mostrando una influencia del solvente utilizado en los parámetros de Arrhenius.

No se detectó un efecto significativo del pretratamiento con microondas en el rendimiento para E ni para FL a 333 K con una relación sólido:solvente 1:17 y empleando como solvente de extracción etanol y posterior lavado con n-hexano. Por otra parte, tanto en muestras pretratadas como sin pretratar, al aumentar la cantidad de solvente

respecto al sólido a procesar se observaron rendimientos similares a los obtenidos en muestras pretratadas con microondas y extraídas con n-hexano a los tiempos analizados. La comparación de imágenes SEM de harinas sin extraer, post extracción con etanol y pos extracción con n-hexano mostraron un efecto de disolución de la matriz estructural en el caso del etanol, mientras que en las muestras extraídas con n-hexano el solvente no pareció tener un efecto sobre la matriz estructural, indicando la importancia del pretratamiento con microondas en la apertura de estructuras y mayor accesibilidad del aceite en la extracción con n-hexano, pero no siendo influyente en la extracción con etanol.

Se propusieron dos métodos de obtención de aceite empleando como solvente etanol: P1, extracción con etanol y tratamiento del extracto con n-hexano y P2, libre de n-hexano. A partir de los dos métodos de obtención de aceite propuestos (P1 y P2), se observó un rendimiento de extracto soluble en n-hexano (FL) obtenido con el Proceso 1 (P1) de aproximadamente un 42%bs, mientras que el Proceso 2 (P2) permitió obtener 3 fracciones: una fase soluble en n-hexano (FL), una fase solida (FS) y una fase de sólidos solubles en la fase rica en solvente (EtF), la cual a su vez presentó compuestos solubles en n-hexano (SH-EtF) e insolubles en dicho solvente.

La adición de los rendimientos de FL y SH-EtF en P2 resultó un valor de 4,2%bs menor al rendimiento de FL obtenido con P1

A su vez el P2 permitió obtener un FL, a diferencia del obtenido con P1, libre de sólidos insolubles en aceite; mostrando la potencialidad del P2 para obtener aceite sin sólidos, sin la utilización de n-hexano.

Tanto con el P1 como con el P2 se obtuvieron fracciones insolubles en n-hexano, compuestos mayormente por carbohidratos; atribuibles a la extracción por parte del etanol de compuestos estructurales de las células y cuerpos grasos.

Con respecto al contenido de tocoferoles, no se detectó efecto del pretratamiento de los granos con microondas, sin embargo el contenido en las fracciones FL con y sin pretratamiento con microondas obtenidas por P1 resultaron mayores a los obtenidos por P2. Por otra parte, se detectaron incrementos de hasta 317% en el contenido de canolol por efecto del microondas, observándose una mayor capacidad de extracción de este compuesto por el etanol con respecto al n-hexano.

Tanto las fracciones FL obtenidas con P1 como las obtenidas con P2 presentaron índices de calidad dentro de los límites permitidos por el Codex Alimentarius (2015), detectando además un efecto significativo y positivo del pretratamiento con microondas sobre los índices de oxidación de los FL, atribuible a un efecto de protección del canolol. Las fracciones SH-EtF obtenidas con P2 presentaron un elevado contenido de antioxidantes, con una concentración de tocoferoles hasta un 467% superior a la concentración en los correspondientes FL obtenidos con P2, y hasta un 2564% de aumento de canolol, confirmando la obtención de un subproducto con una gran concentración de antioxidantes, que contiene la mayor parte del canolol de FL obtenido por P1, de modo que este valioso componente podría extraerse antes de la etapa de refinación en un proceso industrial.

Los resultados muestran la factibilidad de la extracción y separación de aceite con etanol sin la utilización de n-hexano, sin pérdida de calidad en las fracciones oleosas y obteniendo subproductos con elevadas propiedades antioxidantes.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Publicaciones en revistas científicas

- Hexane-free green solvent extraction of canola oil from microwave-pretreated seeds and of antioxidant-rich byproducts. (2018). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco; *European Journal of Lipid Science and Technology*. 120 (9), 1800209, 1-8.
- Ethanol Extraction of Canola Oil: Kinetics and Effects of Type of Solvent and Microwave-Pretreatment. Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco; *Heat and Mass Transfer* (En revisión).

Presentaciones en congresos

- Aceite de canola: estudio exploratorio de extracción con etanol. (2015). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco. VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química (CAIQ2015) – Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 2 – 5 de agosto de 2015. ISSN N° 1850 3519.
- Obtención de aceite de canola libre de insolubles empleando etanol como único solvente. (2016). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández,

Susana M. Nolasco. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos – Córdoba, Argentina, 2, 3 y 4 de noviembre de 2016.

- Extracción con etanol de aceite de canola de granos pretratados con microondas. (2016). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco. CIIAL 2016- 2° Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos – Punta del Este, Uruguay, 13 y 14 de noviembre de 2016. ISBN N° 978-9974-8562-0-2.

- Calidad de Aceites y Subproductos de Canola Obtenidos Mediante un Proceso de Extracción con etanol.(2017). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los alimentos (XVI CYTAL) – Mar del Plata, Argentina, 18 – 20 de septiembre de 2017. ISBN: 978-987-22165-8-0.

Publicaciones en revistas de difusión

- Extracción de aceite de canola utilizando un solvente verde. (2017). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco, A&G 109, Tomo XXVII, Vol. 4, 598-601.

CAPÍTULO 5

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU) DE ACEITE DE CANOLA**5.1. INTRODUCCIÓN**

El ultrasonido de alta intensidad es de interés industrial como un método de extracción alternativo eficiente, simple y reproducible, de relevancia industrial, por su influencia positiva en el incremento de rendimiento y en la reducción significativa del tiempo y temperatura de operación (Vilkhu y col., 2008; Soria y Villamiel, 2010). Los efectos mecánicos involucrados en el ultrasonido pueden acelerar la difusión mejorando la transferencia de masa (Ji y col., 2006), lo cual permite una mayor penetración del solvente, provocada por la cavitación, dentro de la matriz de la muestra. Otros beneficios resultan de la ruptura de las paredes celulares durante la cavitación inducida ultrasónicamente para facilitar la liberación de los compuestos. Las condiciones de operación suaves utilizadas no generan cambios significativos en las propiedades y en la funcionalidad de la mayoría de los compuestos bioactivos, siendo esto de primordial importancia en el caso de componentes sensibles a la temperatura, tales como los tocoferoles.

El ultrasonido es una tecnología emergente utilizada para la extracción de diversos compuestos a partir de diferentes matrices.

Faerman y col. (2002) estudiaron la utilización de ondas acústicas para la destrucción de la pared celular de las micro algas demostrando experimentalmente que la aplicación de ultrasonido a baja frecuencia causa

una fuerte destrucción celular, incluso mayor que cuando se aplican ondas de alta frecuencia. Posteriormente, Cravotto y col. (2008) desarrollaron una técnica de extracción con ultrasonido asistida simultáneamente por microondas, trabajando a frecuencias entre 19 y 300 kHz, obteniendo incrementos significativos en la cantidad de aceite de micro algas extraído en comparación con métodos convencionales.

Con respecto a la extracción de aceite a partir de granos oleaginosos, Zhang y col. (2008) analizaron el efecto del ultrasonido en la extracción de aceite de lino con n-hexano y el efecto sobre la calidad del aceite, no registrando un efecto significativo en la composición ácida de la misma en comparación con una extracción batch convencional. Posteriormente, Li y col. (2004) realizaron la extracción asistida con ultrasonido de aceite de soja utilizando n-hexano, isopropanol y mezcla de ambos, encontrando para todos los casos aumentos en los rendimientos de extracción por efecto del ultrasonido. Con respecto a la obtención de aceite de colza, Sicaire y col. (2016) estudiaron la aplicación de ultrasonido utilizando n-hexano como solvente a partir de colza prensada, encontrando similares tendencias con respecto al rendimiento de extracción. A su vez, Perrier y col. (2017) analizaron el empleo de solventes alternativos al n-hexano en la extracción asistida por ultrasonido de este aceite, observando por un lado el efecto positivo sobre los rendimientos de los tratamientos con ultrasonido y, por otro lado, obtuvieron en las condiciones en las cuales trabajaron resultados prometedores y comparables a los alcanzados con n-hexano al emplear isopropanol, aunque rendimientos bajos al utilizar etanol (96%). En el capítulo 4 de la presente tesis se demostró la factibilidad de la extracción

con etanol de aceite de canola, no obstante, la extracción asistida con ultrasonido con dicho solvente para la obtención de aceite de canola a partir de granos pretratados con microondas y de sus compuestos minoritarios como tocoferoles y canolol aún no ha sido estudiado.

Objetivos

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- Optimizar el proceso de extracción sólido-líquido (etanol) asistido por ultrasonido de aceite de canola a partir de granos pre-acondicionados mediante microondas.
- Estudiar el efecto del empleo de ultrasonido durante el proceso de extracción sólido-líquida de aceite de canola, utilizando etanol como solvente, sobre el rendimientos, índices de calidad y componentes menores (tocoferoles y canolol) de la fracción lipídica.

En virtud de lo expuesto previamente y el efecto no significativo del tratamiento de microondas sobre el rendimiento de aceite demostrado en el Capítulo 4, en el presente capítulo en primer lugar se llevó a cabo un estudio exploratorio de la extracción asistida por ultrasonido de aceite de canola a partir de granos de canola molidos, utilizando etanol 99% como solvente, y analizando la influencia de los parámetros del proceso relación sólido:solvente, amplitud y tiempo de extracción, sobre el rendimiento de extracción. A partir de los resultados obtenidos, se planteó la optimización del proceso empleando granos de canola pretratados con microondas, considerando como variables dependientes rendimientos de productos extraídos y contenido de tocoferoles en los

mismos. Por otra parte, se analizaron algunos parámetros de calidad de la fracción lipídica obtenida en las condiciones óptimas de operación a partir de granos pre-tratados con microondas, evaluando el efecto de la utilización de ultrasonido sobre los mismos.

Finalmente, a modo comparativo, en las condiciones óptimas para la extracción sólido-líquido (etanol) asistida por ultrasonido obtenidas en el presente capítulo, se evaluó, en forma independiente, el efecto del pretratamiento de la materia prima con microondas y el empleo de distintos solventes (n-hexano, etanol 99%, etanol 96%) sobre el rendimiento de productos y contenido de compuestos bioactivos (tocoferoles y canolol).

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Preparación de la materia prima

Granos de canola se trataron según el procedimiento descrito en la sección 2.2.2.2, obteniendo dos muestras: una muestra pretratada con microondas y una muestra sin pretratar. Luego, las mismas fueron molidas como se indicó en la sección 2.2.2.3.

5.2.2. Equipo utilizado en la extracción asistida por ultrasonido

Se utilizó una punta sonicadora VCS-500 (20 kHz, 500 W, Sonics & Materials, USA) con un diámetro de punta de 1,3 cm (**Figura 5-1**), con una amplitud de onda máxima de 114 μm (100%).



Figura 5-1. Punta ultrasónica VCS-500 (Sonics & Materials, USA).

A su vez se determinó la Intensidad de potencia ultrasónica aplicada (IU) (Sicaire y col., 2016) utilizando la ecuación (5.2):

$$IU = \frac{4P}{\pi D^2} \quad (5.1)$$

Donde:

IU: Intensidad de potencia ultrasónica aplicada (W/cm²)

P: potencia absorbida reportada por el equipo expresada en W.

D: diámetro de la punta (cm).

En **Anexo A.3** se presenta la determinación de la potencia absorbida por el equipo ultrasónico según la metodología descrita por Moreno-Castro y col. (2015) y Narváez-Flores y col. (2015), a una amplitud determinada de trabajo y se compara con la reportada por el equipo.

5.2.3. Estudio exploratorio de variables

Con el fin de determinar un diseño de experimentos para optimizar el proceso de extracción asistida por ultrasonido se realizó un estudio exploratorio de distintas variables operativas (relación sólido:solvente, amplitud de ultrasonido y tiempo de extracción) en función del rendimiento de extracto total libre de solvente (E) y rendimiento de fracción lipídica (FL) obtenidos como se describió en la sección 4.2.1.2. Se utilizó como solvente de extracción etanol 99%, utilizando en cada una de las extracciones realizadas un volumen de solvente de 250 mL. Considerando datos bibliográficos referidos a la influencia de la temperatura en las extracciones asistidas por ultrasonido (Sicaire y col., 2016; Perrier y col., 2017), el rango de temperatura de trabajo seleccionado fue de 293-333 K.

A partir de las muestras molidas se realizaron extracciones asistida con ultrasonido en un sistema batch termostatzado empleando la punta sonicadora (ver sección 5.2.2) con distintas relaciones sólido:solvente (1:17; 1:22; 1:28 y 1:34), manteniendo constantes las otras variables independientes (50% de amplitud de ultrasonido, 1800 s de tiempo de extracción y temperatura de 333 K). A partir del resultado obtenido, empleando la relación sólido:solvente seleccionada y manteniendo los valores de las variables temperatura y tiempo de extracción constantes, se realizaron extracciones a distintas amplitudes (20-70%). Finalmente para la relación sólido:líquido y la amplitud seleccionada y operando a 333 K, se evaluaron distintos tiempos de extracción (1800-5400 segundos). Las cuantificaciones se realizaron gravimétricamente y los ensayos se efectuaron por duplicado.

5.2.4. Proceso de extracción asistido por ultrasonido.

5.2.4.1. Estudio de las variables del proceso

Para el estudio de variables de proceso se empleó la metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 1991). Se seleccionó un diseño Doehlert (Doehlert, 1970) con cinco réplicas del centro, donde se seleccionaron tres variables independientes (x_1 , x_2 y x_3) y sus rangos como se muestra en la **Figura 5-2**.

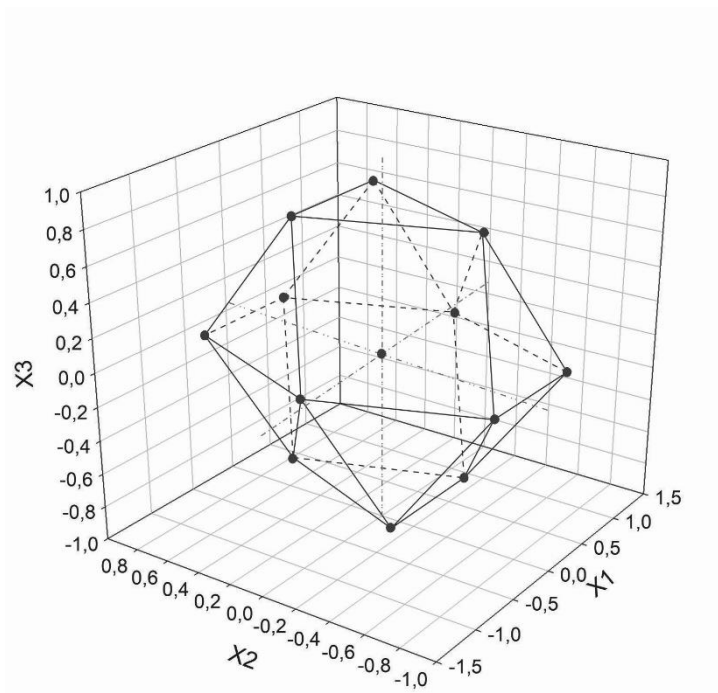


Figura 5-2. Diseño Doehlert de tres variables.

El rango de dichas variables fue determinado en función de los resultados obtenidos en la exploración de variables (sección 5.2.3.), el diseño completo con sus correspondientes niveles se informa en la sección 5.3.3.1. Para los cálculos estadísticos las variables x_i se codificaron como X_i según la ecuación (5.2):

$$X_i = \left(\frac{x_i - x_{oi}}{\Delta x_i} \right) \alpha_i \quad (5.2)$$

Donde:

X_i : valor codificado del i -ésimo factor.

x_i : valor natural del i -ésimo factor.

X_{0i} : valor natural del punto central.

Δx_i : diferencia entre el valor máximo y el central de la variable i .

a_i : valor máximo codificado correspondiente al factor i .

El orden en que se realizaron los ensayos se determinó aleatoriamente.

Las respuesta (variables dependiente) fueron rendimiento de E y FL (%bs) y contenido de tocoferoles totales en el aceite (CTT, $\mu\text{g/g}$), seleccionadas considerando constituyentes propios del grano.

Para el análisis estadístico de las respuestas, el desarrollo de modelos a partir de datos experimentales, la construcción de superficies de repuesta y la predicción de las condiciones que mejoran el rendimiento de aceite se empleó el software Statgraphics Centurión XVI.I. (Monterrosa, 2014).

Los datos experimentales se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden generalizado según la ecuación (5.3):

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (5.3)$$

Donde:

Y_i : respuesta predicha.

X_i : variables independientes en valores codificados.

β_0 : coeficiente independiente.

β_i : coeficientes lineares.

β_{ii} : coeficientes cuadráticos.

β_{ij} : coeficientes de interacción.

Los modelos obtenidos fueron validados a través de un ensayo experimental, empleando un punto de condiciones operativas que no pertenezca al diseño experimental planteado, dentro del dominio del mismo.

5.2.4.2. Optimización del proceso

Se optimizaron las respuestas maximizándolas en función del modelo que se halló mediante el ajuste de la ecuación (5.3), encontrando un valor máximo dentro del dominio del diseño experimental propuesto. Se utilizó el Software GAMS 23.5 (2010) en su versión de prueba para la obtención de los valores óptimos.

Por otra parte, con el fin de evaluar la influencia del ultrasonido en los rendimientos se realizaron extracciones sin aplicación de ultrasonido en un dispositivo batch agitado (ver sección 4.1.1.2), en las condiciones óptimas de proceso.

5.2.4.3. Propiedades de la fracción lipídica (FL)

La fracción lipídica (FL) obtenida en las condiciones óptimas determinadas se caracterizó mediante el valor de acidez (VA), índice de peróxido (IP), valor de p-anisidina (pVA), índice de productos totales de oxidación (Totox), composición acídica, contenido de canolol y de tocoferoles, empleando las técnicas descriptas en el Capítulo 2, sección 2.2.3.

5.2.5. Extracción con distintos solventes

En las condiciones operativas óptimas determinadas en la sección 5.2.4 y empleando granos de canola pretratados con microondas según lo indicado en la sección 5.2.1, se procedió a obtener el extracto total (E) y la fracción

lipídica (FL) de acuerdo a lo descrito en la sección 5.2.3, empleando distintos solventes (n-hexano, etanol 99%, etanol 96%). Se determinaron los rendimientos correspondientes a dichos productos y se cuantificó en las fracciones lipídicas (FL) el contenido de compuestos bioactivos (tocoferoles y canolol), empleando las técnicas descritas en el Capítulo 2 (sección 2.2.3.1) y la composición ácida (sección 2.2.3.2). A su vez, una muestra de granos de canola sin pretratar (ver sección 5.2.1) se procesó en las condiciones mencionadas con anterioridad empleando como solvente etanol 99%, caracterizando FL en lo que respecta composición ácida y sus componentes bioactivos.

5.2.6. Análisis estadístico

Para la detección de diferencias entre los rendimientos observados y mediciones de calidad realizadas se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía en conjunto con el test de Tukey considerándose que las medias eran significativamente diferentes si $p \leq 0,05$, empleando el software Infostat (Di Rienzo y col., 2012).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Estudio exploratorio de variables

En la **Figura 5-3** se muestran los rendimientos de E y FL obtenidos para distintas relaciones sólido:solvente.

Empleando una relación sólido:solvente 1:28 se obtuvo mayores rendimientos de E y de FL con respecto a los obtenidos utilizando relaciones con una menor cantidad de solvente. Sin embargo, a partir de la relación

1:28 no se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los rendimientos de E ni entre los de FL al aumentar la cantidad de disolvente, por lo cual se adoptó dicha relación para las posteriores extracciones.

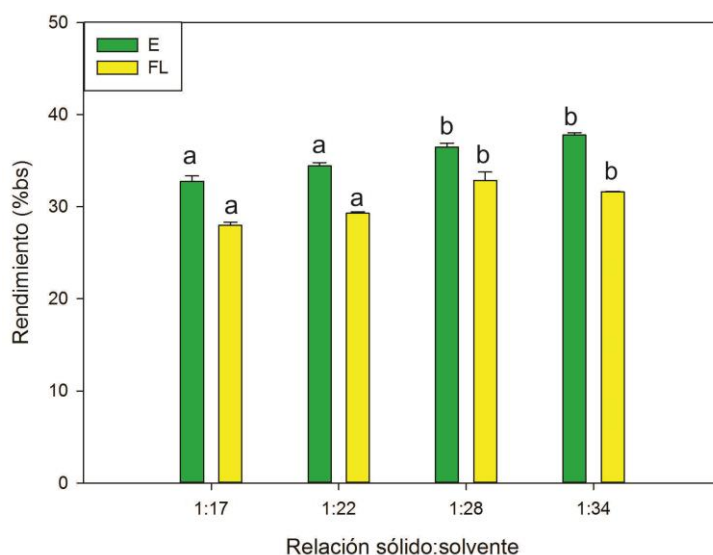


Figura 5-3. Rendimientos de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola a distintas relaciones sólido:solvente. E: extracto total. FL: fracción lipídica. Amplitud de ultrasonido: 50%, Solvente: etanol 99%, Tiempo de extracción: 1800 s, Temperatura: 333 K. Letras diferentes para el mismo color indican diferencias significativas (Tukey test, $p\leq 0,05$)

Cabe destacar, que las diferencias significativas detectadas entre los rendimientos empleando relaciones sólido:solvente 1:17 y 1:34 son resultados acordes a los encontrados en el Capítulo 4 para extracciones de aceite de canola en dispositivos batch con etanol.

Utilizando la relación sólido:solvente seleccionada (1:28) se evaluaron los rendimientos a distintas amplitudes de ultrasonido, para un tiempo de extracción de 1800 segundos y una temperatura de 333 K (**Figura 5-4**).

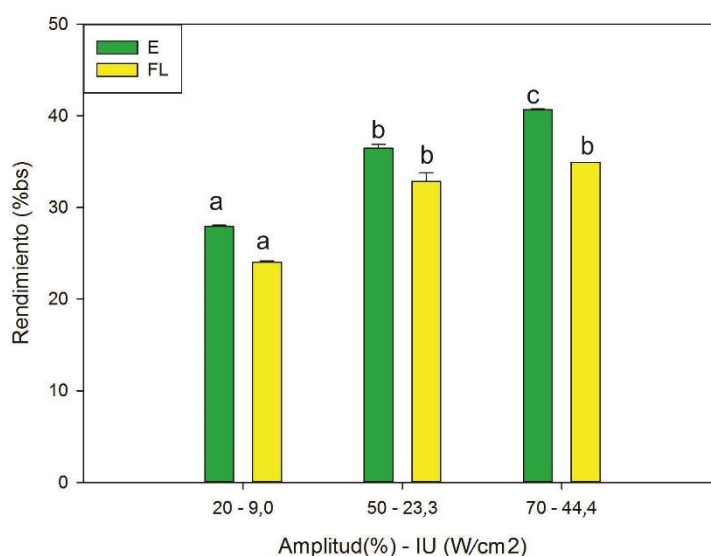


Figura 5-4. Rendimientos de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola a distintas amplitudes de ultrasonido. E: extracto total. FL: fracción lipídica. Solvente: etanol 99%, Relación sólido:solvente: 1:28, Tiempo de extracción: 1800 s, Temperatura: 333 K. Letras diferentes para el mismo color indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$)

A partir de una amplitud de 50% (23,3 W/cm²) no se detectaron diferencias significativas en el rendimiento de FL, mientras que para el extracto total E el mayor rendimiento se obtuvo con 70% de amplitud (44,4 W/cm²). El etanol puede disolver compuestos estructurales de la célula como carbohidratos y fosfolípidos (Baümler y col., 2016), el aumento de la potencia ultrasónica podría favorecer la extracción de estos compuestos. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se utilizó una amplitud de 50% para realizar extracciones durante distintos tiempos (1800 s, 3600 s, 5400 s) con una relación sólido:solvente 1:28 y a 333 K. Los resultados se muestran en la **Figura 5-5**.

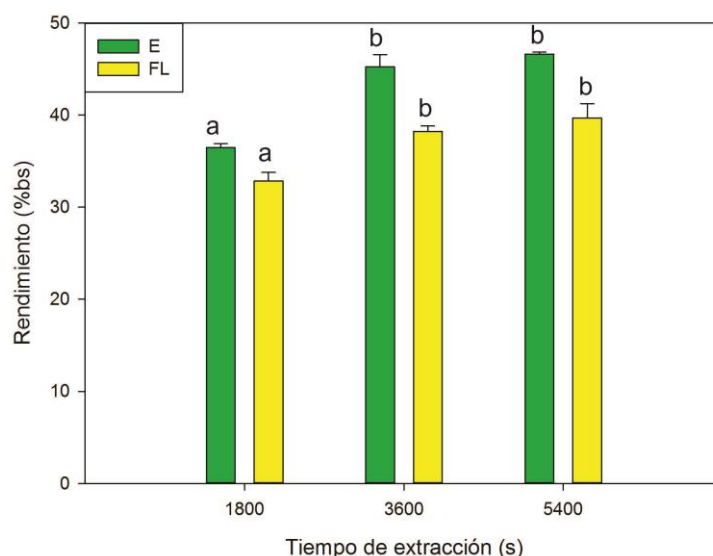


Figura 5-5. Rendimientos de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola a distintos tiempos de extracción. E: extracto total. FL: fracción lipídica. Solvente: etanol 99%, Relación sólido:solvente: 1:28, Amplitud: 50%, Temperatura: 333 K. Letras diferentes para el mismo color indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$)

A partir de los 3600 s no se detectaron diferencias significativas tanto en los rendimientos de FL como de E. A partir de este estudio exploratorio, para el modelado y optimización del proceso de extracción asistido por ultrasonido se priorizaron los resultados obtenidos para la respuesta rendimiento de FL.

5.3.2. Proceso de extracción asistido por ultrasonido, modelos de regresión y análisis de resultados mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR)

5.3.2.1. Diseño experimental y valores experimentales

En función de los resultados obtenidos en las secciones anteriores se seleccionaron las variables independientes Amplitud Ultrasónica (x_1),

Tiempo de extracción (x_2) y Temperatura (x_3), manteniendo constante la relación sólido solvente (1:28). Las respuestas seleccionadas fueron Rendimiento de E ($Y_1\%$ bs), Rendimiento de FL ($Y_2\%$ bs) y contenido de tocoferoles totales CTT (Y_3 , $\mu\text{g/g}$), mientras que los niveles de las variables independientes seleccionadas se muestran en la **Tabla 5-1**.

A su vez, en la **Tabla 5-2** se muestra el diseño experimental con las variables codificadas y los valores experimentales de las tres respuestas seleccionadas, indicando además la intensidad de ultrasonido aplicada.

Tabla 5-1. Diseño experimental: variables independientes y los correspondientes niveles utilizados para la optimización de la extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola pretratados con microondas.

Variable Independiente	Niveles						
Variable codificada, X_1	-1	-0,5	0	0,5	1		
Amplitud ultrasónica, x_1 (%)	20	30	40	50	60		
Variable codificada, X_2	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,866
Tiempo de extracción, x_2 (s)	1680	2100	2520	2940	3360	3780	4200
Variable codificada, X_3	-0,816	0	0,816				
Temperatura, x_3 (K)	293	313	333				

Tabla 5-2. Diseño Experimental Dohelert en variables codificadas utilizado para la optimización de la extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola pretratados con microondas y resultados experimentales para las respuestas seleccionadas.

N°	Intensidad de Ultrasonido aplicada (IU, W/cm ²)	Amplitud Ultrasónica (X ₁)	Tiempo de Extracción (X ₂)	Temperatura (X ₃)	Rendimiento de E Y ₁ (%bs)	Rendimiento de FL Y ₂ (%bs)	CTT Y ₃ (µg/g FL)
1	27,88	0,5	0,866	0,000	45,8	43,4	712,1
2	27,88	0,5	-0,866	0,000	36,0	33,9	750,5
3	16,57	-0,5	-0,866	0,000	24,6	23,6	866,0
4	9,79	-1,0	0,000	0,000	25,0	23,8	845,5
5	16,57	-0,5	0,866	0,000	34,9	33,5	817,0
6	41,44	1,0	0,000	0,000	46,6	45,1	712,1
7	23,36	0,0	0,000	0,000	38,6	37,5	848,2
8	33,90	0,5	-0,289	-0,816	37,0	34,5	704,2
9	24,86	0,0	0,577	-0,816	37,9	36,7	647,0
10	23,36	0,5	0,289	0,816	43,5	41,0	755,3
11	17,33	-0,5	-0,289	-0,816	23,0	22,6	727,1
12	23,36	0,0	0,000	0,000	37,7	35,8	802,9
13	19,59	0,0	-0,577	0,816	35,1	32,6	852,5
14	23,36	0,0	0,000	0,000	38,2	37,1	802,9
15	12,05	-0,5	0,289	0,816	37,3	34,6	871,2
16	23,36	0,0	0,000	0,000	38,6	36,8	844,2
17	23,36	0,0	0,000	0,000	38,6	36,6	844,0

5.3.2.2. Análisis de las variables

Los coeficientes de regresión para las ecuaciones polinomiales de segundo orden para cada una de las variables independientes (respuestas) seleccionadas se muestran en la **Tabla 5-3**. El análisis estadístico indica que el modelo polinomial propuesto fue adecuado, con una falta de ajuste no significativa y valores satisfactorios de R_{ajus}^2 ($R_{ajus}^2 > 0,8$; Ixtaina y col., 2010) para todas las respuestas.

Tabla 5-3. Coeficientes de regresión, R_{ajus}^2 , y falta de ajuste de los modelos completos para los rendimientos de extracto total (E), fracción lipídica (FL) y contenido de tocoferoles totales (CTT).

Coeficientes de regresión	Rendimiento de E	Rendimiento de FL	CTT
	Y ₁ (%bs)	Y ₂ (%bs)	Y ₃ (µg/g FL)
β_0	38,334***	36,740***	828,457***
β_1	10,724***	10,130***	-78,236**
β_2	6,269***	6,127***	-34,488*
β_3	3,679***	2,932***	81,844**
β_{11}	-2,560**	-2,330*	-49,674
β_{22}	-3,162***	-3,393**	-39,507
β_{33}	-2,634**	-3,194**	-81,188*
β_{12}	-0,253	-0,202	6,140
β_{13}	-4,671**	-3,305*	-59,128
β_{23}	-2,023*	-2,436*	24,418
R^2	0,995	0,991	0,940
R_{ajus}^2	0,988	0,979	0,862
Falta de ajuste	0,0596	0,1109	0,3517

*Significancia a nivel 0,05. **Significancia a nivel 0,01. ***Significancia a nivel 0,001.

A su vez, se construyeron modelos simplificados seleccionando solamente los coeficientes de regresión con contribución significativa, según los datos aportados en la **Tabla 5-3**. En la **Tabla 5-4**, se informan los coeficientes de los modelos simplificados.

Tabla 5-4. Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste de los modelos simplificados para los rendimientos de extracto total (E), fracción lipídica (FL) y contenido de tocoferoles totales (CTT).

Coeficientes de regresión	Rendimiento de E	Rendimiento de FL	CTT
	Y ₁ (%bs)	Y ₂ (%bs)	Y ₃ (µg/g FL)
β_0	38,333***	36,740***	804,135***
β_1	10,724***	10,130***	-78,236**
β_2	6,269***	6,127***	-34,488*
β_3	3,679***	2,932***	81,844**
β_{11}	-2,560**	-2,330*	-
β_{22}	-3,162***	-3,393**	-
β_{33}	-2,633**	-3,194**	-66,973*
β_{12}	-	-	-
β_{13}	-4,760***	-3,376*	-
β_{23}	-2,022*	-2,436*	-
R^2	0,995	0,991	0,835
R^2_{ajus}	0,989	0,981	0,781
Falta de ajuste	0,0872	0,1603	0,2105

*Significancia a nivel 0,05. **Significancia a nivel 0,01. ***Significancia a nivel 0,001.

Los valores de R_{ajus}^2 denotan una buena correlación entre los valores observados y los predichos por los modelos con excepción del modelo simplificado para CTT, indicando que como mínimo el 78,1% de la

variabilidad de las respuestas pueden ser explicadas por estos modelos. Asimismo, la prueba de falta de ajuste con valores p superiores a 0,05 en todos los casos, en conjunto con los R_{ajus}^2 mayor a 0,8 permitiría inferir, en principio, que los modelos simplificados desarrollados serían adecuados para describir los valores de rendimiento de extracto total E y rendimiento de FL, mientras que se seleccionó el modelo completo para representar el contenido de tocoferoles totales (CTT).

Para una mejor visualización, las superficies de respuesta de los modelos seleccionados se muestran en las **Figuras 5-6, 5-7 y 5-8**.

5.3.2.3. Respuestas rendimiento de E y FL (Y_1 e Y_2)

Para las respuestas rendimientos total E y FL todos los factores e interacciones resultaron significativos con excepción de la interacción entre los factores amplitud y tiempo de extracción (X_1X_2) según los resultados reportados por el análisis de la varianza (ANOVA, $p \leq 0,05$, Tabla 5-3). En el caso de las respuestas rendimientos los tres factores estudiados influyeron de manera positiva en los términos lineales mientras los términos cuadráticas e interacciones presentaron una influencia negativa. El aumento en la amplitud de ultrasonido conlleva a un aumento en la potencia absorbida, favoreciendo la extracción (Sánchez-Madrigal y col., 2017) lo cual se observa en la tendencia creciente con la amplitud de las superficies correspondientes a los rendimientos.

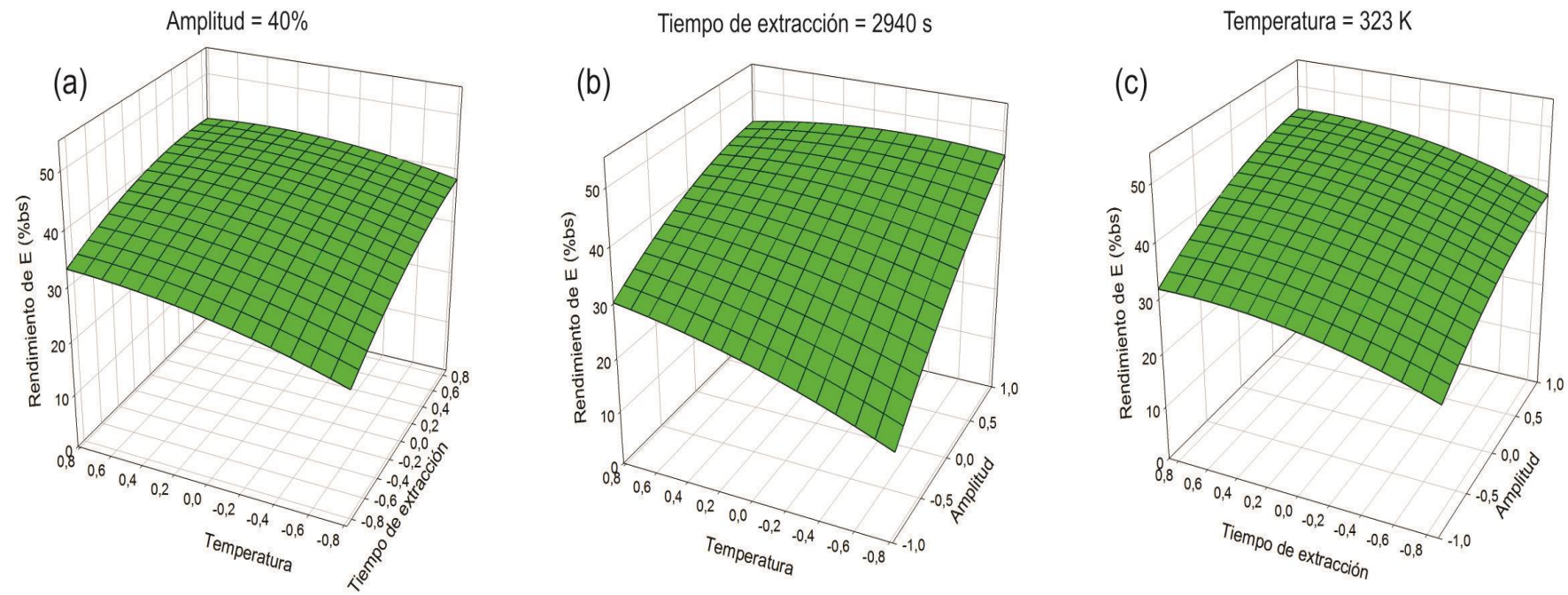


Figura 5-6. Superficies de respuestas. (a) Rendimiento de extracto total (E,%bs) a 40% de amplitud constante. (b) Rendimiento de extracto total (E,%bs) para un tiempo de extracción de 2940 s (c) Rendimiento de extracto total (E,%bs) a temperatura constante de 323 K.

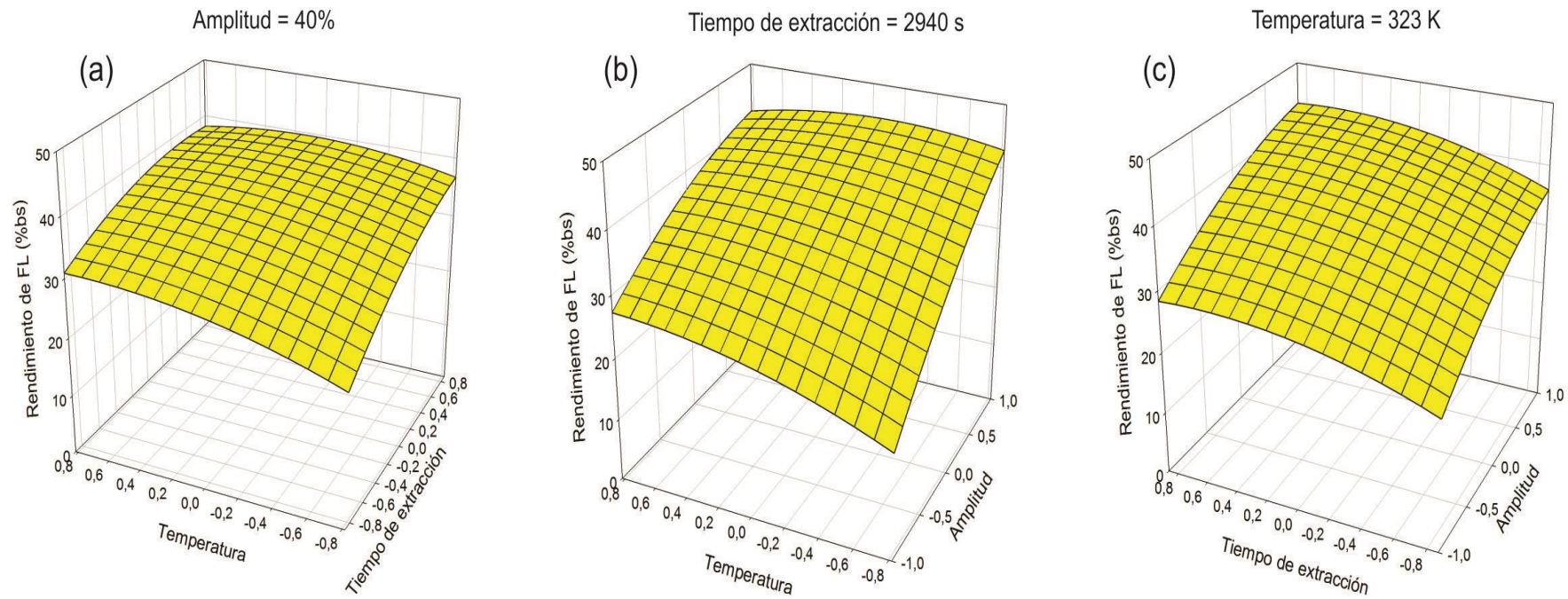


Figura 5-7. Superficies de respuestas. (a) Rendimiento de fracción lipídica (FL,%bs) a 40% de amplitud constante. (b) Rendimiento de fracción lipídica (FL,%bs) para un tiempo de extracción de 2940 s. (c) Rendimiento de fracción lipídica (FL,%bs) a temperatura constante de 323 K.

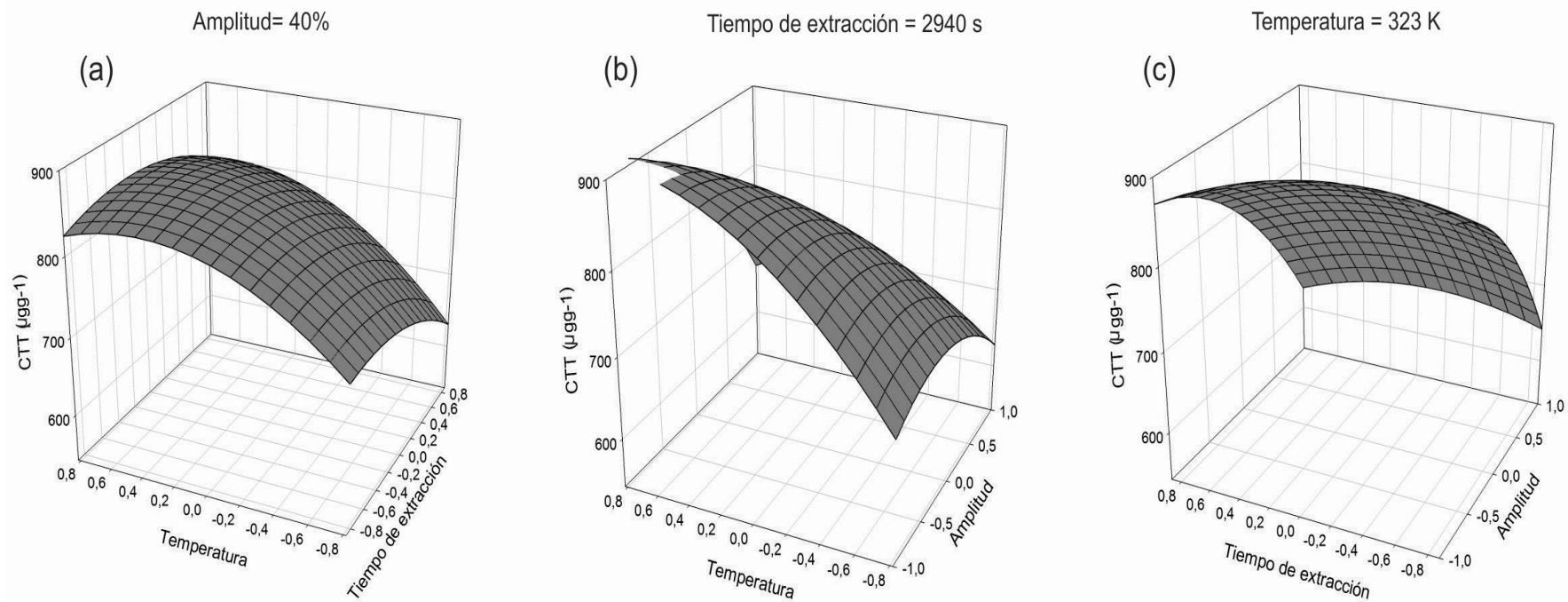


Figura 5-8. Superficies de respuestas. (a) Contenido de tocoferoles totales (CTT, $\mu\text{g/g}$) a 40% de amplitud constante. (b) Contenido de tocoferoles totales (CTT, $\mu\text{g/g}$) para un tiempo de extracción de 2940 s. (c) Contenido de tocoferoles totales (CTT, $\mu\text{g/g}$) a temperatura constante de 323 K.

Con respecto al tiempo de extracción, a mayor tiempo aumenta la extracción (**Figuras 5-6 y 5-7**); por su parte el incremento de la temperatura favorece la extracción de componentes (Pérez y col., 2011; Fernández y col., 2012) pero a su vez podrían provocar la formación de microburbujas de cavitación que implosionan con mayor facilidad, reduciendo la intensidad en la transferencia de masa (Zhang y col., 2008; Goula, 2013) dicho comportamiento opuesto se observa en la superficie de respuesta correspondiente a la respuesta CTT (**Figura 5-8**).

5.3.2.4. Respuesta CTT (Y_3)

Para la respuesta CTT resultaron significativos los términos lineales de todos los factores estudiados y el término cuadrático del factor temperatura. Por su parte se observó un comportamiento distinto en la respuesta CTT respecto a las respuestas rendimientos, siendo negativas las influencias de los factores amplitud y tiempo de extracción, mientras que el factor temperatura presentó una influencia positiva. El aumento en la potencia ultrasónica favorece la degradación de compuestos como los tocoferoles (Pingret y col., 2013), por otra parte podría existir un efecto de dilución debido a la mayor cantidad de aceite extraído. Con el objetivo de eliminar el efecto de dilución del análisis de las variables se calculó la respuesta Y_3 correspondiente al CTT como $\mu\text{g/g}$ de grano en base seca y se ajustaron los datos con un modelo de superficie de respuesta. Los coeficientes del modelo completo y simplificado se muestran en la **Tablas 5-5 y 5-6**.

Tabla 5-5. Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste del modelo completo para la respuesta contenido de tocoferoles totales (CTT) expresado en $\mu\text{g/g}$ grano.

Coeficientes de regresión	CTT
	Y'_3 ($\mu\text{g/g}$ grano)
β_0	304,435***
β_1	51,472***
β_2	35,779**
β_3	49,707**
β_{11}	-43,538*
β_{22}	-44,048*
β_{33}	-51,608**
β_{12}	-8,253
β_{13}	-40,229
β_{23}	-4,082
R^2	0,976
R^2_{ajus}	0,945
Falta de ajuste	0,6080

*Significancia a nivel 0,05. **Significancia a nivel 0,01. ***Significancia a nivel 0,001.

A partir del análisis de la respuesta Y'_3 se observa que el incremento de la amplitud, tiempo de extracción y temperatura favorecen la extracción de tocoferoles, evidenciado en los coeficientes positivos en los términos lineales, los cuales presentan mayor significancia que los efectos cuadráticos negativos. Estos resultados evidencian un efecto de dilución en la respuesta Y_3 indicando una velocidad de extracción diferencial de los tocoferoles con respecto a los compuestos mayoritarios.

Tabla 5-6. Coeficientes de regresión, R^2_{ajus} , y falta de ajuste del modelo simplificado para la respuesta contenido de tocoferoles totales (CTT) expresado en $\mu\text{g/g}$ grano.

Coeficientes de regresión	CTT
	Y'_3 ($\mu\text{g/g}$ grano)
β_0	304,435***
β_1	51,472***
β_2	35,779**
β_3	49,705**
β_{11}	-44,115*
β_{22}	-43,472*
β_{33}	-51,610**
β_{12}	-
β_{13}	-
β_{23}	-
R^2	0,939
R^2_{ajus}	0,903
Falta de ajuste	0,2811

*Significancia a nivel 0,05. **Significancia a nivel 0,01. ***Significancia a nivel 0,001.

Se adopta el modelo simplificado de Y'_3 dado el adecuado valor de R_{ajus}^2 , no obstante, dada la importancia industrial de la respuesta CTT expresada en $\mu\text{g/g}$ de aceite, para la optimización de las respuestas se adoptó la respuesta Y_3 .

5.3.2.5. Validación de los modelos

A los fines de validar los modelos es necesario escoger un punto que no pertenezca al diseño experimental planteado.

En la **Tabla 5-7** se muestran los datos predichos y los valores observados experimentales correspondientes al punto seleccionado (variables codificadas, X_1 : 0,388; X_2 : 0,922; X_3 : 0,023). Para las respuestas

rendimientos (Y_1 e Y_2) los errores relativos observados para el punto de validación entre los valores experimentales y predichos por los modelos seleccionados fueron inferiores a 1%, acorde con los altos R_{ajus}^2 correspondientes a cada modelo, indicando que los modelos generados son aceptables. Sólo en el caso de CTT (Y_3 e Y'_3) dicho error fue mayor, no superando el 10%.

5.3.2.6. Optimización

En la **Tabla 5-8** se muestran, para las condiciones óptimas (máximos) de cada respuesta deseada (Y_1 , Y_2 e Y_3 , máximos los valores de cada respuesta obtenidos con sus correspondientes modelos), los valores experimentales, los predichos por los modelos y el error relativo porcentual.

Tabla 5-7 Valores de las variables independientes (E, FL y CTT) predichos y obtenidos experimentalmente en las condiciones operativas seleccionadas para validar los modelos generados.

Respuesta	X₁(x₁)	X₂(x₂)	X₃(x₃)	Valor predicho	Valor experimental	Error relativo (%)
Rendimiento de E (Y₁, %bs)	0,388 (48%)	0,922 (4260 s)	-0,023 (312K)	45,2	45,2	<0,1
Rendimiento de FL (Y₂, %bs)	0,388 (48%)	0,922 (4260 s)	-0,023 (312K)	43,1	43,2	0,3
CTT (Y₃, µg/g FL)	0,388 (48%)	0,922 (4260 s)	-0,023 (312K)	725,5	668,0	8,6
CTT (Y'₃, µg/g grano)	0,388 (48%)	0,922 (4260 s)	-0,023 (312K)	312,6	288,8	8,2

Tabla 5-8 Condiciones óptimas para el proceso de extracción con etanol asistida por ultrasonido de granos de canola pretratado con microondas.

Respuesta	X₁(x₁)	X₂(x₂)	X₃(x₃)	Valor predicho (%bs)	Valor experimental (%bs)	Error relativo (%)
Rendimiento de E (Y₁, %bs)	0,879 (57%)	0,464 (3600 s)	-0,111 (310K)	48,1	48,1	<0,1
Rendimiento de FL (Y₂, %bs)	0,886 (57%)	0,456 (3600 s)	-0,087 (311K)	46,1	47,0	2,1
CTT (Y₃, µg/g FL)	-0,783 (24%)	-0,198 (2640 s)	0,59 (327K)	910,0	1035,1	12,1

En todos los casos los valores experimentales verificaron los valores predichos por los modelos en los puntos óptimos, obteniendo bajos errores relativos. La respuesta CTT experimental fue mayor a la predicha para Y_3 . Dicha diferencia es consistente con el menor valor de R_{ajus}^2 del modelo en comparación con las respuestas Y_1 e Y_2 . Cabe destacar que si bien se obtuvo un máximo en la concentración de tocoferoles, los rendimientos de E y FL para este punto (-0,783; 0,194; 0,59; **Tabla 5-8**) fueron 27,9%bs y 23,4%bs, respectivamente, por lo que las condiciones óptimas para CTT no permiten obtener altos rendimientos de extracción. Esto puede atribuirse a una extracción no proporcional de ambos compuestos, aceite y tocoferoles totales, pudiendo generar la mayor extracción de aceite un efecto de dilución de los tocoferoles en aceite (Nolasco y col., 2004). Las condiciones óptimas para los rendimientos de extracto total (E) en general coincidieron con las condiciones para la respuesta FL, con excepción de la temperatura que se diferenció en un grado Kelvin. Cabe destacar que para el rendimiento de FL se obtuvo el valor correspondiente al contenido de aceite informado en la composición proximal del grano en el Capítulo 2, sección 2.3.1. Mientras que Ramos y col. (2017) obtuvieron el valor del contenido de aceite de canola determinado por extracción con Soxhlet utilizando n-hexano a las 4 horas de extracción; por lo que a partir de la utilización del ultrasonido y etanol como solvente, en las condiciones óptimas (**Tabla 5-8**), se logró reducir un 75% el tiempo de extracción. A su vez, con el fin de analizar la influencia del ultrasonido se realizó la extracción en las condiciones óptimas para la respuesta FL en un dispositivo batch sin aplicación de

ultrasonido, obteniendo un rendimiento de E de $32,0 \pm 0,2\%$ bs y de FL de $24,7 \pm 0,6\%$ bs, por lo que el empleo del ultrasonido permitió incrementar en 90,1% el rendimiento de FL.

En función de los resultados obtenidos y dados que se obtuvo un bajo valor de rendimiento de FL para el óptimo de la respuesta CTT ($23,4 \pm 0,1\%$ bs), se seleccionaron como condiciones óptimas para esta operación las correspondientes a la respuesta rendimiento de FL (Amplitud = 57%; tiempo de extracción = 3600 s y Temperatura = 311 K) ya que se considera la variable de mayor relevancia a nivel industrial.

5.3.2.7. Parámetros de calidad del aceite obtenido en las condiciones óptimas

En la **Tabla 5-9** se presentan los valores de diferentes índices de calidad para el aceite obtenido en las condiciones óptimas (Amplitud = 57%; tiempo de extracción = 3600 s y Temperatura = 311 K), a partir de granos pretratados con microondas.

Tabla 5-9. Valor de acidez (*VA*), Índice de peróxidos (*IP*), valor de p-anisidina (*pVA*) y valor de Totox (*Totox*) para el aceite obtenido en las condiciones óptimas correspondiente al rendimiento de la fracción lipídica (*FL*) (Extracción con etanol asistida por ultrasonido, temperatura 311 K, tiempo de extracción 3600 s y 57% de amplitud granos pretratados con microondas)

Parámetro de calidad	Valor
VA (mgKOH/g FL)	1,87±0,03
IP (meq O₂/kg FL)	7,0±0,5
pVA	9,5±0,7
Totox	23,5±1,7

VA: Valor de acidez. IP: Índice de Peróxidos. pVA: Valor de p-anisidina. Totox: valor de Totox.

Los valores de *VA* e *IP* fueron inferiores a los límites permitidos para aceites vírgenes (valor de acidez, 4,0 mgKOH/g aceite; índice de peróxidos, 15 meq O₂/kg aceite Codex Alimentarius, 2015). El valor de *VA* no fue significativamente diferente (ANOVA, $p > 0,05$) al obtenido para *FL* a partir de granos pretratados con microondas extraído con etanol 99% en un dispositivo batch sin aplicación de ultrasonido (1,61±0,05 mgKOH.g⁻¹, **Tabla 4-9**, proceso a 330 K durante 4 horas) mientras que los valores de *IP*, *pVA* y *Totox* resultaron significativamente superiores (ANOVA, $p \leq 0,05$) a los obtenidos en dichas condiciones (3,2±0,1 meq O₂ kg⁻¹; 6,6±0,1; 12,9±0,1; respectivamente. **Tabla 4-9**, proceso a 330 K durante 4 horas). Los factores que afectan la degradación de los lípidos incluyen, entre otros, la energía entregada al sistema y el oxígeno (Choe y Min, 2006), ambos factores se encuentran presentes en el procesamiento de matrices alimentarias con ultrasonido (Pingret y col., 2013), lo que podrían justificar el comportamiento observado.

5.3.3. Extractos obtenidos con distintos solventes

En la **Tabla 5-10** se muestra el rendimiento de los extractos obtenidos con diferentes solventes a partir de granos pretratados con microondas y procesados bajo las condiciones óptimas determinadas para la extracción sólido-líquida asistida con ultrasonido (Amplitud = 57%; tiempo de extracción = 3600 s y Temperatura = 311 K).

Se obtuvieron los mayores rendimientos tanto para E como FL utilizando etanol 99% como solvente y para granos pretratados con microondas, mientras que los menores rendimientos se obtuvieron utilizando etanol 96%. A su vez, se detectaron diferencias significativas entre las muestras pretratadas y sin pretratar evaluadas utilizando etanol 99% como solvente, mientras que cuando no se aplicó ultrasonido (ver Capítulo 4) no se detectó una influencia del microondas sobre el rendimiento de FL utilizando etanol 99% como solvente. El comportamiento observado en este trabajo indica un efecto combinado del pretratamiento con microondas y la extracción asistida por ultrasonido en los rendimientos de extracción, logrando incrementar los mismos.

Con respecto a la composición de ácidos grasos no se detectaron diferencias significativas en los aceites extraídos con los distintos solventes y condiciones de pretratamiento estudiadas, a su vez no resultaron significativamente diferente a la composición de ácidos grasos de aceite extraído con n-hexano por Soxhlet (sección 2.3.3.2).

Tabla 5-10. Rendimientos de extracto total (E) y fracción del extracto soluble en n-hexano (FL) obtenidos por extracción asistida por ultrasonido para distintos solventes a partir de granos con o sin pretratamiento con microondas; algunas características de los FL obtenidos.

Pretratamiento	Microondas			Sin pretratar
Solvente	Et 99%	N-hexano	Et 96%	Et 99%
Rendimiento E (%bs)	50,1 ^d ±1,4	40,0 ^b ±0,9	29,1 ^a ±1,2	47,3 ^c ±0,7
Rendimiento FL (%bs)	47,1 ^c ±0,6	40,0 ^b ±0,9	26,9 ^a ±1,0	42,9 ^b ±0,7
Composición de ácidos grasos de FL (% del total de ácidos grasos)				
C16:0	4,0 ^a ±0,3	4,2 ^a ±0,2	4,2 ^a ±0,1	4,1 ^a ±0,1
C18:0	1,8 ^a ±0,2	1,7 ^a ±0,1	1,5 ^a ±0,1	1,6 ^a ±0,1
C18:1	65,3 ^a ±0,7	66,8 ^a ±0,4	65,9 ^a ±0,1	67,0 ^a ±0,4
C18:2	21,4 ^a ±2,5	19,7 ^a ±0,3	20,3 ^a ±0,1	19,5 ^a ±0,1
C18:3	7,4 ^a ±1,7	7,5 ^a ±0,1	8,1 ^a ±0,2	7,8 ^a ±0,3
Concentración de compuestos bioactivos en FL				
canolol (µg/g)	133,3 ^c ±0,9	94,3 ^b ±0,9	210,4 ^d ±1,5	15,5 ^a ±1,8
α-TC (µg/g)	159,0 ^a ±0,4	300,8 ^c ±2,3	293,9 ^c ±3,5	178,8 ^b ±3,3
β-TC (µg/g)	36,7 ^a ±1,2	29,9 ^a ±4,5	56,2 ^b ±0,7	42,7 ^{a,b} ±5,4
γ-TC (µg/g)	435,5 ^a ±1,6	535,5 ^b ±11,5	717,3 ^c ±6,0	506,0 ^b ±8,4
δ-TC (µg/g)	11,8 ^a ±1,4	18,0 ^a ±7,8	20,5 ^a ±0,8	13,9 ^a ±0,2
CTT (µg/g)	643,1 ^a ±1,4	884,3 ^c ±26,1	1087,9 ^d ±11,0	741,4 ^b ±16,8

Et 99%: Etanol 99%. Et 96%: Mezcla de Etanol-Agua 96%. C16:0, ácido palmítico; C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oleico; C18:2, ácido linoleico; C18:3, ácido linolénico. CTT: Tocoferoles totales. α-TC: Alfa tocoferol. β-TC: Beta tocoferol. γ-TC: Gama tocoferol. δ-TC: Delta tocoferol. Todos los valores de tocoferoles y canolol se expresan en µg tocoferol/ g de FL. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, p≤0,05).

Se detectó un incremento de 762% en el contenido de canolol por efecto del pretratamiento con microondas, a su vez el ultrasonido permitió incrementar en 102% el contenido de canolol con respecto a una

extracción batch con el mismo solvente para el mismo grano pretratado con microondas ($65,9 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{g/g}$, Capítulo 4). El ultrasonido provoca cambios y rupturas en las paredes celulares debido a la micro cavitación, facilitando la liberación de componentes de la célula (Sánchez-Madrigal y col., 2017).

El mayor CTT fue observado para la extracción con etanol 96%, mientras que el aceite (FL) extraído con etanol 99% a partir de granos pretratados presentó el menor CTT, siendo a su vez menor que en el aceite obtenido con el mismo solvente pero sin pretratamiento con microondas (**Tabla 5-10**). Dado que para las diferentes condiciones de extracción de la **Tabla 5-10** se obtuvieron distintos rendimientos de FL y con el fin de eliminar el efecto de dilución en el análisis de los componentes (Nolasco y col., 2004), en la **Tabla 5-11** se informan los contenidos correspondientes de tocoferoles y canolol expresados como $\mu\text{g/g}$ grano en base seca.

Tabla 5-11. Contenido de tocoferoles y canolol en las fracciones de extracto soluble en n-hexano (FL) obtenidas a partir de granos con y sin pretratamiento con microondas y diferentes solventes, expresados como $\mu\text{g/g}$ grano en base seca.

Compuesto ($\mu\text{g/g}$ grano bs)	Pretratamiento Solvente			
	Microondas Et 99%	Microondas n-hexano	Microondas Et 96%	Sin pretratatar Et 99%
canolol	63,6 ^d ±0,4	37,9 ^b ±0,3	56,6 ^c ±0,4	6,9 ^a ±0,3
α-TC	76,0 ^a ±0,2	120,8 ^b ±0,9	79,1 ^a ±0,9	72,7 ^a ±7,0
β-TC	17,5 ^a ±0,6	12,0 ^a ±4,2	15,1 ^a ±0,2	18,7 ^a ±1,8
γ-TC	208,0 ^a ±0,8	215,1 ^a ±31,8	193,1 ^a ±1,6	206,8 ^a ±20,1
δ-TC	5,6 ^a ±0,7	7,2 ^a ±3,1	5,5 ^a ±0,2	5,6 ^a ±0,5
CTT	307,1 ^a ±2,2	355,2 ^a ±40,1	292,8 ^a ±3,0	303,7 ^a ±29,4

Et 99%: Etanol 99%. Et 96%: Mezcla de Etanol-Agua 96%. CTT: tocoferoles totales. α -TC: Alfa tocoferol. β -TC: Beta tocoferol. γ -TC: Gama tocoferol. δ -TC: Delta tocoferol. Todos los valores de tocoferoles y canolol se expresan en μg tocoferoles/ g de grano en base seca. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Test de Tukey, $p \leq 0,05$).

A partir de los resultados de la **Tabla 5-11** se observa que el canolol presenta la misma tendencia detectada en la **Tabla 5-10** con respecto al pretratamiento con microondas, sin embargo el contenido de canolol en la FL (expresado en $\mu\text{g/g}$ grano bs) cuando se utilizó etanol absoluto como solvente de extracción fue superior al obtenido con etanol 96%, y a su vez mayor al observado con n-hexano. El comportamiento observado con respecto al n-hexano y etanol 99% fue similar al registrado al realizar una extracción convencional (batch, Capítulo 4), lo que se puede atribuir a una mayor solubilidad del canolol en solventes con mayor polaridad que el n-hexano.

Con respecto al contenido de tocoferoles totales (CTT) expresados en base a masa de grano en base seca no se detectó diferencias significativas para los FL obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas, sugiriendo que

las diferencias observadas en la **Tabla 5-10** se deben a un efecto de dilución.

Cabe destacar que la cantidad de tocoferoles totales extraídos de los granos en las condiciones operativas óptimas encontradas para la respuesta FL (307,1 $\mu\text{g/g}$ grano bs) fue superior a la lograda con las condiciones óptimas operativas para la respuestas concentración de tocoferoles totales en el aceite Y₃ (242,5 $\mu\text{g/g}$ grano bs), confirmando la elección del óptimo de FL como condiciones óptimas para la extracción asistida por ultrasonido de aceite de canola.

5.4. CONCLUSIONES PARCIALES

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) utilizando etanol 99% como solvente a partir de granos pretratados con microondas permitió obtener altos rendimientos de extracción.

Se modelaron las respuestas rendimiento de extracto total (E), rendimiento de fracción lipídica (FL) y contenido de tocoferoles totales (CTT), siguiendo la metodología superficie de respuesta. En función de la amplitud de ultrasonido, tiempo de extracción y temperatura, obteniéndose altos coeficientes de correlación para los modelos propuestos.

A su vez, a partir de los modelos propuestos, se optimizaron las respuestas, logrando reducir el tiempo de extracción de la fracción lipídica (FL) en un 75% con respecto a la extracción en Soxhlet utilizando n-hexano como solvente. La combinación del pretratamiento con

microondas y la extracción asistida con ultrasonido, usando etanol 99%, mejoró el rendimiento de FL respecto de EAU a partir de canola no tratada, mostrando un efecto sinérgico entre ambos procesos.

En las condiciones operativas óptimas encontradas para el rendimiento de FL se analizó la calidad de la fracción registrando índices de oxidación dentro de los límites establecidos por norma.

La incorporación de la asistencia con ultrasonido del proceso de extracción sólido-líquido (etanol 99%) de granos de canola pretratados con microondas permitió incrementar el contenido de canolol en el aceite obtenido. Asimismo, se logró una mayor extracción de canolol al emplear etanol absoluto (99%) como solvente, respecto al empleo de etanol 96% o n-hexano.

La cantidad de tocoferoles extraída estadísticamente fue independiente del solvente utilizado y el empleo de pretratamiento con microondas, no obstante la concentración de los mismos en la fracción lipídica (FL) fue mayor al utilizar etanol 96% como solvente de extracción, coincidiendo con una menor obtención de FL, lo que sugiere un efecto de dilución por parte del aceite.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la potencialidad del uso de EAU para la obtención de aceite de canola utilizando un solvente verde como el etanol, reduciendo los tiempos de procesamiento, la polución ambiental y logrando obtener una fracción lipídica con elevada calidad y concentración de antioxidantes.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS***Publicaciones en revistas científicas***

- Optimization of Green-Solvent Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Canola Oil and Tocopherol Content. Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco. *Food and Bioprocess Technology* (En revisión).

Presentaciones en congresos

- Extracción con etanol asistida con ultrasonido de aceite de canola. (2018). Ramiro J. Sánchez, María B. Fernández, Susana M. Nolasco Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP 2018- San Rafael, Mendoza- Argentina. 11, 12 y 13 de Abril. ISBN 978-987-46333-1-6.

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de Tesis permitió estudiar diferentes procesos emergentes para la extracción de aceite de canola describiendo y analizando sus efectos, principalmente, en dos características importantes para la industria: el rendimiento de extracción y la calidad del aceite obtenido.

En el recorrido de elaboración de la tesis doctoral y a partir de la obtención de resultados parciales, el trabajo evolucionó hacia la incorporación e integración de las diferentes tecnologías estudiadas, partiendo del análisis de un pretratamiento con microondas y la extracción del aceite con n-hexano (**Capítulo 2 y 3 objetivos específicos 1 al 3,**); continuando con el estudio de la extracción de aceite con un solvente verde como el etanol a partir de granos pretratados con microondas y sin pretratar (**Capítulo 4, objetivos específicos 4 y 5**) y culminando con el acoplamiento de las tecnologías, en la extracción asistida por ultrasonido utilizando etanol como solvente a partir de granos pretratados con microondas (**Capítulo 5, objetivos específicos 6 y 7**).

A su vez, en el **Capítulo 2**, se desarrolló una metodología para la cuantificación de un compuesto de interés particular característico de granos de *Brassica* tratados térmicamente, canolol, el cual constituyó un indicador de calidad y valor agregado con el cual se evaluaron las diferentes tecnologías.

En virtud de ello, se sintetizan las siguientes conclusiones generales:

Pretratamiento con microondas y extracción de aceite con n-hexano

– La aplicación de microondas a los granos de canola previo a la extracción por solvente con n-hexano permitió incrementar significativamente el rendimiento de aceite con respecto a muestras sin dicho pretratamiento.

– En general, en el conjunto de ensayos experimentales de extracción sólido-líquido (n-hexano) realizados no se detectó un deterioro de la calidad del aceite de canola por efecto del pretratamiento de los granos con microondas. Si bien en algunas muestras se observaron influencia del pretratamiento sobre determinados índices de calidad relacionados con la estabilidad oxidativa del aceite (índice de peróxidos, valor de p-anisidina y valor de Totox), los mismos se mantuvieron con valores inferiores a los requeridos por normativas vigentes. Al mismo tiempo, se determinó un incremento importante en el contenido de canolol en el aceite de canola al ser pretratados los granos con microondas (hasta un 517%); permitiendo obtener un aceite de mayor calidad dadas las propiedades antioxidantes y bioactivas de este compuesto.

– En primera instancia, la cinética de extracción con n-hexano de aceite de granos de canola pretratados con microondas se modeló adecuadamente a través del modelo de difusión de Fick modificado, el

cual contempla una etapa de lavado inicial y posteriormente un proceso difusivo; determinándose mediante un algoritmo de cálculo la cantidad de términos de la serie del modelo que resultan significativos y, que a su vez, mantiene al mismo de forma adecuada para describir los fenómenos involucrados. Los coeficientes de difusión efectiva (D_{eff}) calculados (muestras pretratadas con microondas y sin pretratar) presentaron una dependencia del tipo Arrhenius con la temperatura, mientras que las fracciones de lavado con respecto al tiempo infinito (M_o/M_∞) permanecieron constante con la temperatura. Para todas las temperaturas analizadas, los D_{eff} correspondientes a la muestra pretratada con microondas al menos duplicaron a los determinados para la muestra sin dicho pretratamiento, mostrando similar tendencia a la informada en literatura para el pretratamiento hidrotérmico de granos de canola. La fracción de lavado obtenida para la muestra irradiada con microondas resultó ligeramente superior al valor obtenido de la muestra sin pretratar, siendo el incremento inferior al reportado en literatura para el efecto de un pretratamiento hidrotérmico de los granos canola.

– Posteriormente, los estudios realizados respecto a la cinética de extracción de granos de canola pretratados con microondas y sin pretratar permitieron desarrollar un modelo de difusión de Fick modificado bidimensional teniendo en cuenta la dependencia con la temperatura y el tiempo de extracción (asumiendo M_o/M_∞ independiente de la temperatura), el cual permitió describir los fenómenos involucrados y obtener parámetros característicos del sistema. El modelo obtenido

también exhibió un aumento en el parámetro pre exponencial de Arrhenius (D_0) debido al pretratamiento, que podría mostrar el efecto de la radiación de microondas en la estructura de la muestra, facilitando el proceso de extracción de aceite con n-hexano.

– A partir de los resultados obtenidos se acepta la hipótesis I: *La aplicación de pretratamiento mediante microondas modifica la cinética de extracción del aceite de canola a partir de granos molidos.*

– La cinética de extracción de aceite con n-hexano a diferentes temperaturas (298–333 K) para tres muestras de granos de canola acondicionados de diferentes manera (pretratados con microondas, pretratado hidrotérmicamente, sin ninguno de los anteriores pretratamientos) se modeló empleando un Red neuronal artificial (RNA). Se utilizó una red perceptron feedforward multicapa, empleando como datos de entrada las categorías de muestras de canola y pretratamientos y las variables temperatura y tiempo, mientras que el rendimiento de aceite relativo al rendimiento infinito se consideró como dato de salida.

– En general, se detectó una mayor precisión de ajuste de la RNA con respecto al modelo de difusión (MD) correspondiente. Cabe destacar que el RNA presenta la ventaja de poder incluir variables cualitativas, como origen de la muestra original y pretratamientos directamente como las variables independientes, mientras que en MD estos atributos deben ser analizados por separados. Un único modelo RNA representó la cinética de extracción de aceite dentro del rango de las variables estudiadas, permitiendo describir un proceso dependiente de múltiples variables a

partir de un conjunto de datos incompletos, facilitando potencialmente su transferencia a la industria.

Extracción sólido-líquido con etanol

- La utilización de etanol absoluto como solvente produjo la extracción no solo de aceite sino también la de compuestos insolubles en n-hexano.
- En una primera instancia la fracción lipídica (FL) se cuantificó lavando con n-hexano el extracto total libre de solvente (E), obteniendo a su vez una fracción insoluble en n-hexano (EIH). Este procedimiento se denominó P1.
- No se detectó un efecto significativo del pretratamiento con microondas en los rendimientos de extracción a 333 K, dicho comportamiento podría atribuirse a un efecto de disolución de estructuras por parte del etanol independientemente de la aplicación de un pretratamiento con microondas.
- No se detectaron diferencias significativas entre los rendimientos de FL y del aceite obtenido por extracción con n-hexano operando a 333 K (relación sólido:solvente de 1:17), a partir de las 2 horas para muestras sin pretratar y a partir de las 4 horas para muestras pretratadas con microondas; sin embargo los rendimientos de FL fueron generalmente inferiores al disminuir la temperatura de trabajo.
- En determinadas condiciones de operación se lograron rendimientos de aceite extraídos con etanol similares a los logrados empleando n-hexano, consistente con la hipótesis II: *El empleo de etanol*

como solvente en el proceso de extracción sólido-líquido de canola (sin pretratar y pretratadas con microondas) permite obtener rendimientos de aceite similares a los alcanzados usando *n*-hexano, sin embargo en ningún experimento realizado se lograron mayores rendimientos utilizando etanol.

- Al mismo tiempo, la cinética de extracción con etanol para la muestra sin pretratar presentó diferencias con respecto a la extracción con *n*-hexano, detectándose una menor fracción de lavado pero mayor coeficiente de difusión. Dicha cinética de extracción fue ajustada con el modelo de difusión de Fick modificado bidimensional desarrollado previamente. Estos resultados de los estudios cinéticos son concordantes con la hipótesis III: *La cinética de extracción de aceite de canola con etanol difiere de la correspondiente al empleo de n-hexano.*

- Con respecto a la separación de los insolubles en *n*-hexano presentes en E, se desarrolló un proceso sin la utilización de *n*-hexano P2 (evaporación parcial de etanol, enfriamiento, centrifugación, decantación, evaporación total de solvente) el cual permitió obtener tres fracciones: una fracción que es soluble en *n*-hexano (FL), una fase sólida (FS) y una fase de sólidos solubles en la fase rica en solvente (EtF). A su vez, EtF presentó compuestos solubles en *n*-hexano (SH-EtF) e insolubles en *n*-hexano. Las fracciones SH-EtF presentaron un elevado contenido de antioxidantes, con una concentración de tocoferoles hasta un 467% superior a la concentración en las fracciones FL y hasta un 2564% de aumento de canolol, confirmando la obtención de un subproducto con una gran concentración de antioxidantes, que contiene la mayor parte

del canolol extraído, de modo que este valioso componente podría extraerse antes de la etapa de refinación en un proceso industrial.

- Si bien el pretratamiento con microondas, en las condiciones ensayadas, no afectó los rendimientos de extracción permitió incrementar hasta un 317% el contenido de canolol en FL, el cual fue superior al obtenido mediante extracciones con n-hexano. Las fracciones FL presentaron en todos los casos índices de calidad dentro de los límites permitidos por el Codex Alimentarius.

- El tratamiento con microondas de los granos de canola, previo al proceso de extracción con etanol, influyó positivamente sobre la calidad del aceite en lo que respecta a los índices de oxidación y el contenido de canolol, sin embargo, no afectó significativamente el rendimiento de aceite, por lo que se rechaza la hipótesis IV: *El pretratamiento con microondas del grano de canola influye en el rendimiento de extracción y en las propiedades (calidad) del aceite obtenido con etanol como solvente de extracción.*

Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

- La aplicación de ultrasonido en la extracción con etanol de aceite de canola a partir de granos pretratados con microondas permitió reducir los tiempos de extracción hasta en un 75% con respecto a la extracción por Soxhlet utilizando n-hexano, obteniendo los mismos rendimientos. A partir de un análisis de variables se modelaron y optimizaron las respuestas rendimiento de extracto total (E), rendimiento de fracción

lipídica (FL) y contenido de tocoferoles totales (CTT) empleando la metodología superficie de respuesta y considerando como variables independientes la amplitud de ultrasonido, el tiempo de extracción y la temperatura de trabajo, obteniendo altos coeficientes de correlación para los modelos propuestos. En las condiciones óptimas determinadas, la incorporación de asistencia con ultrasonido al proceso de extracción con etanol de granos de canola pretratados con microondas permitió incrementar, aproximadamente en 90%, el rendimiento de FL. Asimismo, la combinación del pretratamiento con microondas y la EAU empleando etanol al 99% mostró un efecto sinérgico entre ambos procesos.

– Con respecto a los índices de calidad, la fracción lipídica obtenida en las condiciones óptimas determinadas para el proceso (relativa a FL) presentó valores similares o superiores a los observados en un proceso sin utilización de ultrasonido, sin embargo siempre fueron inferiores a los límites permitidos. Por otra parte se detectó un efecto positivo en lo que respecta al contenido de canolol en el aceite al incorporar la asistencia de ultrasonido en la extracción.

– Los resultados obtenidos en este estudio muestran la potencialidad del uso de EAU para la extracción de aceite de canola utilizando un solvente verde, reduciendo los tiempos de procesamiento, la polución ambiental y logrando obtener un aceite con elevada calidad y concentración de antioxidantes.

– La aplicación de ultrasonido en la extracción de aceite con etanol a partir de granos de canola pretratados con microondas permitió obtener mayores rendimientos respecto a un proceso sin su utilización. Sin embargo, el empleo de ultrasonido afectó negativamente algunos índices de calidad pero permitió incrementar el contenido de canolol, por lo que se rechaza la hipótesis V: *La asistencia mediante ultrasonido mejora el rendimiento de aceite por extracción con solvente (etanol) de granos de canola pretratados con microondas, sin afectar propiedades del mismo.*

PERSPECTIVAS FUTURAS

En función de los resultados obtenidos se propone el diseño de procesos de extracción a escala piloto incorporando el pretratamiento con microondas y la extracción asistida por ultrasonido, evaluando los costos involucrados y eficiencia energética.

Teniendo en cuenta la importante generación de canolol en el aceite de canola por efecto de tratamiento con microondas, se prevé el estudio de la estabilidad oxidativa de los aceites con distintas concentraciones de canolol durante el almacenamiento.

A su vez, se plantea la optimización de la relación sólido:solvente a utilizar con un consiguiente estudio de la cinética de extracción a dicha relación y del proceso de separación de fases desarrollado en el Capítulo 4. También se considera de interés la realización del diseño a escala piloto de un proceso de extracción de aceite con etanol incorporando dicha separación de fase, analizando el proceso de manera integral, incluyendo la recuperación del solvente.

En estudios futuros es necesario analizar la composición de los subproductos obtenidos (caracterización de azúcares, cuantificación y caracterización de fosfolípidos, compuestos fenólicos, etc.) mediante el proceso de separación de fases y evaluar sus propiedades funcionales, con una potencial aplicación en formulación de alimentos. En este contexto, se sugiere también la adición de estos subproductos en

distintas matrices alimentarias analizando las propiedades funcionales y antioxidantes.

Con respecto al grano de canola, se propone el estudio de la extracción con etanol de harina de canola post extracción mediante prensado, optimizando el proceso de extracción, separación de fases y análisis de calidad de los productos obtenidos.

Por último se proyecta el estudio de la aplicación de las tecnologías emergentes incluyendo la utilización de etanol como solvente a la extracción de aceite de otros granos, como girasol alto oleico alto esteárico, chía y semillas de zapallo.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreotti Dagostin, J.L., Carpiné, D., Corazza, M.L. (2015). Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics. *Industrial Crops and Products*, 74, 69-75.
- Arballo, J.R., Campañone, L.A., Mascheroni, R.H. (2010). Modeling of microwave drying of fruits. *Drying Technology*, 28(10), 1178-1184.
- Azadmard-Damirchi, S., Habibi-Nodeh, F., Hesari, J., Nemati, M., Achachlouei, B. F. (2010). Effect of pretreatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. *Food Chemistry*, 121(4), 1211-1215.
- Baruch, I., Genina-Soto, P., Nenkova, B., Barrera-Cortés, J. (2004). Neural model of osmotic dehydration kinetics of fruits cubes. En Busler, C., Fensel, D. (Eds.) *International Conference on Artificial Intelligence: Methodology, Systems, and Applications* (pp. 312-320). Berlin, Alemania: Springer.
- Baümler, E.R., Carrín, M.E., Carelli, A.A. (2016) Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178,190-197.
- Baümler, E., Fernández, M.B., Nolasco, S.M., Pérez, E.E. (2014). Comparison of safflower oil extraction kinetics under two characteristic moisture

conditions: statistical analysis of non-linear model parameters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(2), 553-559.

Brauner, N., Shacham, M. (1997). Statistical analysis of linear and nonlinear correlation of the Arrhenius equation constants. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 36(3), 243-249.

Boucher, D.F., Brier J.C., Osburn J.O. (1942). Extraction of Oil from Porous Solid, *Transactions of the American Institute of Chemical Engineering*, 38, 967-993.

Cao, X., Tsukamoto, T., Seki, T., Tanaka, H., Morimura, S., Cao, L., Tatematsu, M. (2008). 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *International Journal of Cancer*, 122(7), 1445-1454.

Carré, P., Citeau, M., Dauguet, S. (2018). Hot ethanol extraction: economic feasibility of a new and green process. *OCL*, 25(2), D206.

Calzada, J., Di Yenno, F. (2017). Capacidad de producción de etanol de Argentina no llega al 2% de la de EE.UU. *Informativo Semanal Bolsa de Comercio de Rosario*, 35(1813), 1-3.

Chang, H. (2016). Relación entre la calidad del aceite de soja y la disminución del contenido de material grasa residual en la harina, durante el proceso de extracción por solvent. *A&G – Aceites y Grasas* 102(1), 94-110.

- Changala Magdaleno, A. (2012). *Obtención de aceite de cachichin (Oecopetalum mexicanum) aplicando tecnología emergente*. (tesis de grado), Universidad Veracruzana, Vera Cruz, México.
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Chien, J., Hoff, J., Lee, M., Lin, H., Chen, Y., Chen, L. (1990). Oil extraction of dried ground corn with ethanol. *The Chemical Engineering Journal* 43:B103-B113.
- Choe, E., Min, D.B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety*, 5(4), 169e186.
- Codex Alimentarius (2015). *Norma General para los Aditivos Alimentarios CODEX STAN 210-1999*. Organizacion mundial de la salud.
- Contreras, C., Benlloch-Tinoco, M., Rodrigo, D., Martínez-Navarrete, N. (2017). Impact of microwave processing on nutritional, sensory, and other quality attributes. En Regier M., Knoerzer K., Schubert H. (Eds.) *The Microwave Processing of Foods (Second Edition)*. Duxford, UK: Woodhead Publishing.
- Cortese, C.M., Portela, G., Sanchez, R.J. (2017). Exploring the effect of combined hydrothermal-microwave pretreatment operating conditions on canola oil expression. *Journal of Food Technology and Preservation*, 1(3), 1-6.

- Crank, J. (1979). *The mathematics of diffusion*. Oxford, UK: Oxford university press.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5):898–902.
- Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.M., Hickling, D. (2001). Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*, 196(1), 87-104.
- Day, G.S., Schoemaker, P.J. (2000). Avoiding the pitfalls of emerging technologies. *California Management Review*, 42(2), 8-33.
- Demarco, A. (2009). Capítulo III: Extracción por solvente. En Block, J.M., Barrera, D. (Eds.) *Temas Selectos en Aceites y Grasas Volumen 1 - Procesamiento*. Sao Paulo, Brasil: Editorial Blucher.
- Dev-C++ (Versión 5.5.3) [Software]. (2013). Obtenido de [http://
http://www.bloodshed.net/](http://http://www.bloodshed.net/)
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2012). InfoStat (Versión 20121) [Software]. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Obtenido de <http://www.infostat.com.ar>.
- Doehlert, D.H. (1970). Uniform shell designs. *Applied Statistics*, 19(3), 231-239.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3), 350-356.
- Duvernay, W.H., Assad, J.M., Sabliov, C. M., Lima, M., Xu, Z. (2005). Microwave extraction of antioxidant components from rice bran. *Pharmaceutical Engineering*, 25(4), 126.
- Faerman, V., Mukmenev, I., Shreiber, I. (2002). Sonication of Microalgae and its Precipitation. *Acta Acustica United with Acustica*, 88(4), 592-593.
- FAO/OMS Fats and Oils in Human Nutrition (Octubre 2019). *FAOSTAT Commodities by country*. Roma, Italia: World Health Organization. Recuperado de http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country.
- Fathi, M., Mohebbi, M., Razavi, S.M.A. (2011). Application of image analysis and artificial neural network to predict mass transfer kinetics and color changes of osmotically dehydrated kiwifruit. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1357-1366.
- Fernández, M.B., Perez, E.E., Nolasco, S.M., Crapiste, G.H. (2008). Estudio comparativo de la dependencia con la temperatura del coeficiente de difusión de aceite de canola y girasol durante la extracción con n-hexano. En Robledo, C.W. (Presidente) *III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Córdoba, Argentina: Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba.

- Fernández, M.B., Perez, E.E., Crapiste, G.H., Nolasco, S.M. (2012). Kinetic study of canola oil and tocopherol extraction: parameter comparison of nonlinear models. *Journal of Food Engineering*, 111(4), 682-689.
- Ferrari, R.A., Schule, A., Esteves, W., Bruhl, L. Mukhejee, K.D. (1996). Minor Constituents of Vegetable Oils During Industrial Processing. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 73, 587.
- Fillion, B., Morsi, B.I., Heier, K.R., Machado, R.M. (2002). Kinetics, gas-liquid mass transfer, and modeling of the soybean oil hydrogenation process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(4), 697-709.
- Firestone, D. (1998). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, 5th edn. Champaign-Illionois, USA: Edition Analytical methods.
- Fondo Monetario Internacional (2018). *IMF Primary Commodity Prices*. Recuperado de <https://www.imf.org/external/np/res/commod/index.aspx>. Fecha de consulta Octubre de 2018.
- Lertworasirikul, S., Saetan, S. (2010). Artificial neural network modeling of mass transfer during osmotic dehydration of kaffir lime peel. *Journal of Food Engineering*, 98(2), 214-223.
- GAMS (Versión 23.5.2) [Software]. (2010). Obtenido de <https://www.gams.com/download-old/>

- Gandhi, A.P., Joshi, K.C., J.K., Parihar, V.S., Srivastav, D.C., Raghunadh, P., Kawalkar, J., Jain, S.K., Tripathi, R.N. (2003). Studies on alternative solvents for the extraction of oil soybean. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(3), 369–375.
- Ghazani, S.M., García-Llatas, G., Marangoni, A.G. (2014). Micronutrient content of cold-pressed, hot-pressed, solvent extracted and RBD canola oil: Implications for nutrition and quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(4), 380-387.
- Global Chemical Price (2014). *Hexane weekly report 22 Feb, 2014*. Navrangpura, India: Jay Infochem Pvd. Ltd.
- Goula, A.M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil–kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 492-498.
- Grasso, F.V., Maroto, B.G., Camusso, C.C. (2006). Pretratamiento Enzimático de Expandido de Soja para la Extracción de Aceite con Solvente. *Información Tecnológica*, 17(3), 41-46.
- Grasso, F.V. (2013). *Diseño del proceso: Pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna* (tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Hagan, M.T., Demuth, H.B., Beale, M.H. (1996). *Neural network design*. Boston, USA: PWS Pub.

- Hron R., Koltun S. (1984). An aqueous ethanol extraction process for cottonseed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 61(9), 1457-1460.
- Huang, A.H. (1992). Oil bodies and oleosins in seeds *Annual Review of Plant Biology*, 43, 177-200.
- Igathinathane, C., Pordesimo, L.O., Columbus, E.P., Batchelor, W.D., Methuku, S.R. (2008). Shape identification and particles size distribution from basic shape parameters using ImageJ. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63(2), 168-182.
- ImageJ (Versión 1.50i) [Software]. (2016). Obtenido de <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.
- Imran, M., Nadeem, M., Manzoor, M.F., Javed, A., Ali, Z., Akhtar, M.N., Ali, M., Hussain, Y. (2016). Fatty acids characterization, oxidative perspectives and consumer acceptability of oil extracted from pre-treated chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), 162.
- InfoLEG Información Legislativa (2018). *Biocombustibles Ley 26.093*. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Justicia y Derechos Humanos Presidencia de la Nación. Recuperado de <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/115000-119999/116299/norma.htm>.
- Iriarte, L.; Valetti, O.E. (2002). El cultivo de colza en Argentina. *IDIA XXI (Argentina)*, 2(3), 160-166.

- IUPAC (1992). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th edn. Paquot C., Hautfenne A. (Eds.). Oxford, UK: Blackwell Scientific.
- Ixtaina, V.Y., Vega, A., Nolasco, S.M., Tomás, M.C., Gimeno, M., Bárzana, E., Tecante, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(1), 192-199.
- Izquierdo, N.G., Aguirrezábal, L.A.N., Andrade, F.H., Pereyra, V.R. (2002). Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crops Research*, 77(2), 115-126.
- Ji, J. B., Lu, X.H., Cai, M.Q., Xu, Z.C. (2006). Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(5), 455-462.
- Karnofsky, G. (1986). Design of oilseed extractors. I. Oil extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(8), 1011-1014.
- Kraljić, K., Škevin, D., Barišić, L., Kovačević, M., Obranović, M., Jurčević I. (2015.) Changes in 4-vinylsyringol and other phenolics during rapeseed oil refining. *Food Chemistry*, 187, 236-242.
- Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wähälä, K., Heinonen, M. (2003). Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food Research and Technology*, 217(2), 110-114.

- Kozłowska, H., Naczek, M., Shahidi, F., Zadernowski, R. (1990). Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. En Shahidi, F. (Ed.) *Canola and Rapeseed* (pp. 193-210). New York, USA:Springer.
- Kuldiloke, J. (2002). *Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices* (tesis doctoral). Universidad Técnica de Berlín, Berlín, Alemania.
- Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T., Maeda, H. (2004). Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (canolol) isolated from canola oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(14), 4380-4387.
- Lane, R.H., Qureshi, A.A., Salser, W.A. (1997). *U.S. Patent N°. 5,591,772*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Lertworasirikul, S., Saetan, S. (2010). Artificial neural network modeling of mass transfer during osmotic dehydration of kaffir lime peel. *Journal of Food Engineering*, 98(2), 214-223.
- Li, H., Pordesimo, L., and Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731-738.
- Lin, L., Allemekinders, H., Dansby, A., Campbell, L., Durance-Tod, S., Berger, A., Jones, P.J. (2013). Evidence of health benefits of canola oil. *Nutrition reviews*, 71(6), 370-385.

Linnet, L. (2004). *International Publication Number WO 2014/053180*. UN: World Intellectual Property Organization.

Matlab R2013B (Versión 8.2.0.701) [Software]. (2013). The Math Works Inc.

Mattea M. (2001). Fundamentos sobre el prensado de semillas oleaginosas. En Asociación Argentina de Grasas y Aceites (Ed.) *A&G Libro 10° Aniversario Tomo I*, (pp. 484-492). Rosario, Argentina: Editorial Amalevi.

Matthäus, B. (2012). Chapter 17 Effect of Canolol on Oxidation of Edible Oils. En Thiyam-Holländer, U., Eskin, N. M., Matthäus, B. (Eds.) *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*. (pp. 291-306). New York, USA: CRC Press.

McDonald, B. (2012). Chapter 13 Canola Oil and Heart Health: A Historical Perspective. En En Thiyam-Holländer, U., Eskin, N. M., Matthäus, B. (Eds.) *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*. (pp. 221-231). New York, USA: CRC Press.

Ministerio de Hacienda Presidencia de la Nación^a (2018). *Estadísticas de biodiesel y bioetanol*. Recuperado de <http://datos.minem.gob.ar/dataset/estadisticas-de-biodiesel-y-bioetanol>. Fecha de consulta Octubre de 2018.

Ministerio de Hacienda Presidencia de la Nación^b (2018). *Reporte de Precios Bioetanol*. Recuperado de https://glp.se.gob.ar/biocombustible/reporte_precios_bioetanol.php. Fecha de consulta Octubre de 2018

- Ministerio de Producción y Trabajo Presidencia de la Nación (2018). *Datos agroindustriales – Estimaciones agrícolas*. Recuperado de <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=> Estimaciones. Fecha de consulta Octubre de 2018.
- Monterrosa, J. Statgraphics Centurion (Versión XVI. I.) [Software]. (2014). Bogotá, Colombia: Facultad de Ciencias Económicas - Universidad Nacional de Colombia.
- Montgomery, D.C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. México, México: Grupo Editorial Iberoamericana.
- Moreno-Castro, L.E, Quintero-Ramos, A., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Sánchez-Madrigal, M.A.C.O., Meléndez-Pizarro, C.O., Pérez-Reyes I., Lardizábal-Gutiérrez, D.D. (2015). Nixtamalization assisted with ultrasound: effect on mass transfer and physicochemical properties of nixtamal, masa and tortilla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 265-279.
- Morley, K.L., Grosse, S., Leisch, H., Lau, P.C. (2013). Antioxidant canolol production from a renewable feedstock via an engineered decarboxylase. *Green Chemistry*, 15(12), 3312-3317.
- Mustakas, G.C. (1980). Recovery of oil from soybeans. En Erikson, D.R. (Ed.) *Handbook of Soy Oil Processing and Utilization* (pp. 49-65). St. Louis, USA:
- Nolasco, S.M., Aguirrezábal, L.A.N., Crapiste, G.H. (2004). Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(11), 1045-1051.

- Oomah, B.D., Busson, M., Godfrey, D.V., Drover, J.C.G. (2002). Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76(1), 33-43.
- Patricelli, A., Assogna, A., Casalaina, A., Emmi, E., Sodini, G. (1979). Fattori che influenzano l'estrazione dei lipidi da semi decorticati di girasole. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 61, 136-142.
- Pérez, E. (2001). *Obtención y caracterización de aceites y harinas de girasol silvestre: Helianthus petiolaris* (tesis doctoral). Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Perez, E.E., Carelli, A.A., Crapiste, G.H. (2011). Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 180-185.
- Perrier, A., Delsart, C., Boussetta, N., Grimi, N., Citeau, M., Vorobiev, E. (2017). Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 58-65.
- Peterson, C.L., Reece, D.L., Hammond, B.L., Thompson, J., Beck, S.M. (1997). Processing, Characterization, and Performance of Eight Fuels from Lipids. *Applied Engineering in Agriculture*, 13(1), 71-79.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593-606.

- Rafiq, M.Y., Bugmann, G., Easterbrook, D.J. (2001). Neural network design for engineering applications. *Computers & Structures*, 79(17), 1541-1552.
- Ramos L. (2014). *Aplicación de tecnología emergente “microondas” como tratamiento previo a la extracción de aceite de canola* (tesis de grado). Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Olavarria, Argentina.
- Ramos, L.B., Sánchez, R.J., de Figueiredo, A.K., Nolasco, S.M., Fernández, M.B. (2017). Optimization of microwave pretreatment variables for canola oil extraction. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12431.
- Ramzi, M., Kashaninejad, M., Salehi, F., Mahoonak, A.R.S., Razavi, S.M.A. (2015). Modeling of rheological behavior of honey using genetic algorithm-artificial neural network and adaptive neuro-fuzzy inference system. *Food Bioscience*, 9, 60-67.
- Rao, R.K., Arnold, L.K. (1956.) Alcoholic extraction of vegetable oils. III. Solubilities of babassu, coconut, olive, palm, rapeseed, and sunflower seed oils in aqueous ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 33(9), 389-391.
- Ratnayake, W.M.N., Daun, J.K. (2004). Chemical composition of canola and rapeseed oils. En Gunstone, F.D. (Ed.) *Rapeseed and Canola Oil* (pp. 37–73). Oxford, UK: Blackwell Publishing Limited.

- Rataus, M. (2001). La extracción por solvente. En Asociación Argentina de Grasas y Aceites (Ed.) *A&G Libro 10° Aniversario Tomo I*, (pp. 495-504). Rosario, Argentina: Editorial Amalevi.
- Rotolo, D., Hicks, D., Martin, B.R. (2015). What is an emerging technology? *Research Policy*, 44(10), 1827-1843.
- Sánchez, R.J., Mateo, C.M., Fernández, M.B., Nolasco, S.M. (2017). Bidimensional modeling applied to oil extraction kinetics of microwave-pretreated canola seeds. *Journal of Food Engineering*, 192, 28-35.
- Sánchez-Madrigal, M.Á., Amaya-Guerra, C.A., Quintero-Ramos, A., Báez-González, J.G., Núñez-González, M.A., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Garzón-Tiznado, J.A. (2017). Ultrasound-assisted extraction of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) at different ultrasound powers and solid-liquid ratios. *Food Science and Technology (Campinas)*, 37(2), 261-268.
- Sawada M.M., Venâncio L.L., Toda T.A., Rodrigues C.E. (2014). Effects of different alcoholic extraction conditions on soybean oil yield, fatty acid composition and protein solubility of defatted meal. *Food Research International*, 62, 662-670.
- Seth, S., Agrawal, Y.C., Ghosh, P.K., Jayas, D.S., Singh, B.P.N. (2007). Oil extraction rates of soya bean using isopropyl alcohol as solvent. *Biosystems Engineering*, 97(2), 209-217.

- Shahidi, F. (1990). *Canola and rapeseed: production, chemistry, nutrition, and processing technology*. New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Shahidi, F. (2005). *Bailey's industrial oil and fat products. Sexta edición*. New York, USA: Hoboken.
- Shrestha, K., Stevens, C.V., De Meulenaer, B. (2012). Isolation and identification of a potent radical scavenger (canolol) from roasted high erucic mustard seed oil from Nepal and its formation during roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7506-7512.
- Shokri, A., Hatami, T., Khamforoush, M. (2011). Near critical carbon dioxide extraction of Anise (*Pimpinella Anisum* L.) seed: Mathematical and artificial neural network modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 58(1), 49-57.
- Sicaire, A.G., Vian, M.A., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., Chemat, F. (2016). Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 319-329.
- Sicaire, A.G., Vian, M., Fine, F., Joffre, F., Carré, P., Tostain, S., Chemat, F. (2015) Alternative bio-based solvents for extraction of fat and oils: solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8430-8453.

- Siddiqui, I.R., Wood, P.J., Khanzada, G. (1973). Low molecular weight carbohydrates from rapeseed (*Brassica campestris*) meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(11), 1427-1435.
- Siddiqui, I.R., Wood, P.J. (1977). Carbohydrates of rapeseed: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(6), 530-538.
- SigmaPlot (Versión 12.0.) [Software]. (2011). Alemania: Systat Software Inc.
- Simpson, C.J., Fitzhenry, M.J., Stamford, N.P.J. (2005). Preparation of vinylphenols from 2-and 4-hydroxybenzaldehydes. *Tetrahedron Letters*, 46(40), 6893-6896.
- Soria, A.C., Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.
- Spielmeyer, A., Wagner, A., Jahreis, G. (2009). Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chemistry*, 112(4), 944-948.
- Suslick, K.S., Shoh, A. (1998). *Ultrasound. Its Chemical, Biological and Physical Effects*. New York, USA: Acoustical Society of America.
- Stahl, E., Schuetz, E., Mangold, H.K. (1980). Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1153-1157.

- Tan, C.P., Man, Y.C., Jinap, S., Yusoff, M.S.A. (2001). Effects of microwave heating on changes in chemical and thermal properties of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(12), 1227-1232.
- Thakor, N.J., Sokhansanj, S., Sosulski, F.W., Yannacopoulos, S. (1999). Mass and dimensional changes of single canola kernels during drying. *Journal of Food Engineering*, 40(3), 153-160.
- Thobani M., Diosady, LL. (1997). Two-phase solvent extraction of canola. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(3), 207-214.
- Tripathi M.K., Mishra A.S. (2007). Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 132(1-2), 1-27.
- Tzen, J., Huang, A. (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *The Journal of Cell Biology*, 117(2), 327-335.
- Uquiche, E., Jeréz, M., Ortiz, J. (2008). Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 495-500.
- Uyazán, A.M., Gil, I.D., Aguilar, J., Rodríguez, G., Caicedo, L.A. (2006). Producción de alcohol carburante por destilación extractiva: Simulación del proceso con glicerol. *Ingeniería e Investigación*, 26(1), 45-50.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A

review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.

Viro, M., Tomao, V., Ginies, C., Chemat, F. (2008). Total lipid extraction of food using d-limonene as an alternative to n-hexane. *Chromatographia*, 68(3-4), 311-313.

Vuorela S., Kreander K., Karonen M., Nieminen R., Hämäläinen M., Galkin A., Laitinen L, Salminen J-P., Moilanen E., Pihlaja K. (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5922-5931.

Wakamatsu, D., Morimura, S., Sawa, T., Kida, K., Nakai, C., Maeda, H. (2005). Isolation, identification, and structure of a potent alkyl-peroxyl radical scavenger in crude canola oil, canolol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(8), 1568-1574.

Windauer, L.B., Ploschuk, E.B. (2006). Cultivos productores de aceites. En de la Fuente, E. B., Gil, A., Gimenez, P. I., Kantolic, A. G., Lopez Pereira, M., Ploschuk, E. L., Sorlino, D. M., Vilariño, P., Wassner, D. F., Windauer, L. B. (Eds.) *Cultivos Industriales* (pp. 65-94). Azul, Argentina: Facultad de Agronomía.

Wong-González, E. (2010). ¿Después de un análisis de variancia qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 349-356.

- World Health Organization. (1993). Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation. En FAO (Ed.) *FAO Food and Nutrition Paper* (Vol. 57) (pp. 147). Roma, Italia: WHO; FAO.
- Yatsu L., Jacks T. (1972). Spherosome membranes: half unit-membranes. *Plant physiology*. 49(6), 937-943.
- Zago, E., Lecomte, J., Barouh, N., Aouf, C., Carré, P., Fine, F., Villeneuve, P. (2015). Influence of rapeseed meal treatments on its total phenolic content and composition in sinapine, sinapic acid and canolol. *Industrial Crops and Products*, 76, 1061-1070.
- Zárate, V., Perez, E.E., Crapiste, G.H., Nolasco, S.M., Fernández, M.B. (2015). Oil extraction kinetics of hydrothermally pretreated canola seeds. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 93(5), 842-848.
- Zhang, Z.S., Wang, L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X.D., Mao, Z.H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 192-198.

A1. CAPÍTULO 1**A1.1. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en los siguientes subgrupos: ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, lignanos, estilbenos y polímeros fenólicos complejos (Vuorela y col., 2003). En las plantas oleaginosas en general, los principales compuestos fenólicos son derivados de ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, así como cumarinas, flavonoides y ligninas (Kozłowska y col., 1990), en particular en colza, los principales compuestos fenólicos son derivados del ácido hidroxicinámico (Vuorela y col., 2003). Los ácidos fenólicos tienen funcionalidad de ácido carboxílico y entran en las subclases, ácidos hidroxicinámico e hidroxibenzoico.

A1.2. Compuestos fenólicos en harina de colza

Los ácidos fenólicos en colza están presentes principalmente en forma esterificada. Los ésteres fenólicos pueden constituir tanto como el 99% del total de compuestos fenólicos en la harina de colza. El principal éster fenólico en la colza es la sinapina, el éster de colina del ácido sinápico (**Figura A1**). Además de la colina, el ácido sinápico se puede esterificar con otro ácido fenólico o azúcares (Kozłowska y col., 1990).

Amarowicz y col. (2000) aislaron de la harina de colza el sinapato de glucopiranosilo, un glucósido fenólico (**Figura A1**).

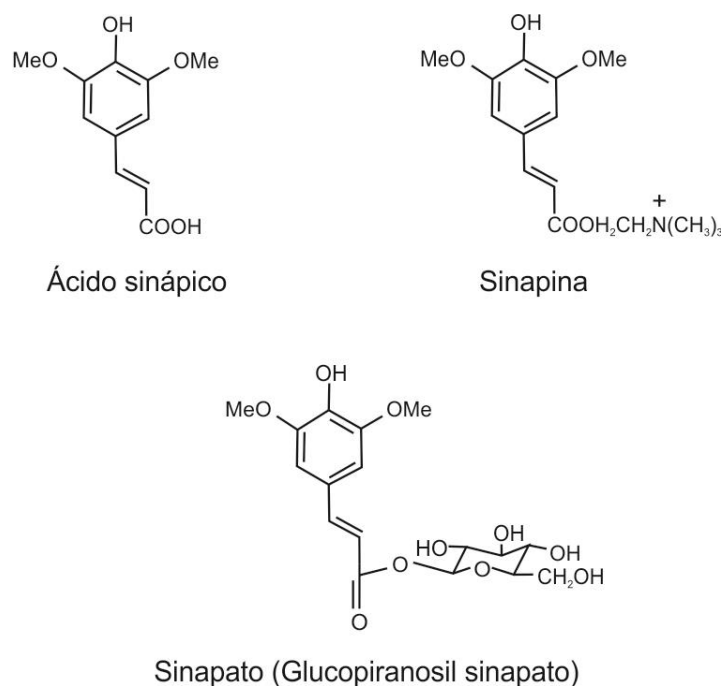


Figura A1. Principales fenólicos en harina de colza.

Otros ácidos fenólicos como el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vainillínico y el ácido sirínico también pueden formar enlaces éster (Kozłowska y col., 1983). La composición de los ácidos fenólicos esterificados está genéticamente controlada, pero sus contenidos se ven afectados por el cultivo, la variabilidad genética y las condiciones de crecimiento. La colza contiene 0,39-1,06% de sinapina dependiendo de la especie, las condiciones de crecimiento y el grado de maduración (Kozłowska y col., 1990; Naczek y col., 1998). La sinapina tiene un papel importante en colza como almacenamiento de ácido sinápico y colina en plantas jóvenes. Durante la maduración de los granos, parte de la sinapina se hidroliza para liberar el ácido sinápico y la colina. El ácido sinápico es un compuesto de partida en la síntesis de ligninas y

flavonoides, mientras que la colina es un producto metabólico importante del ciclo de metilación (Kozłowska y col., 1990).

Después de la hidrólisis de los ésteres de ácido fenólico, el ácido sinápico es el ácido fenólico predominante.

Los ácidos fenólicos libres constituyen el 6,5-9,0% de los compuestos fenólicos totales en las harinas de colza. Algunas variedades son excepcionales ya que contienen solo cantidades mínimas o incluso ninguna cantidad detectable de ácidos fenólicos libres. Los compuestos fenólicos más importantes en colza son derivados del ácido sinápico. El mismo pertenece al grupo ácido hidroxicinámico y constituye el 70,2-85,4% de los ácidos fenólicos libres en las harinas desgrasadas de colza (Vuorela y col., 2003). Otros ácidos fenólicos presentes en la colza son ácido ferúlico, ácido o-cumárico, p-cumárico, cafeico, phydroxybenzoic, vanillic, gentisic, protocatechic, siríngico y clorogénico (Kozłowska y col., 1983; Shahidi y Naczki, 1992). Además de estos, Kozłowska y col. (1983) encontraron también ácidos salicílicos y cinámicos en la harina de colza.

A1.3. Canolol

Como se describió anteriormente, los principales compuestos fenólicos en los granos de canola son los ácidos fenólicos esterificados, siendo la sinapina, el éster de colina del ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico) el principal compuesto (Matthaüs, 2012). Algunos compuestos fenólicos libres, también están presentes siendo el ácido sinápico el compuesto principal de este grupo (Shahidi y Naczki, 1992).

Recientemente se ha identificado otro derivado del ácido sinápico debido a su actividad antioxidante altamente potente y las propiedades antimutagénicas y anticarcinógenas (Kuwahara y col., 2004; Vuorela y col., 2005; Cao y col., 2008). Este derivado, 2,6-dimetoxi-4-vinilfenol, vinilsiringol o canolol (**Figura A2**), fue identificado por Koski y col. (2003) y Wakamatsu y col. (2005) en aceite de canola crudo. Se ha determinado que el vinilsiringol es el principal compuesto fenólico en el aceite de colza crudo (629 ppm en aceite cuantificado como equivalentes de ácido sinápico, Vuorela y col. 2003).

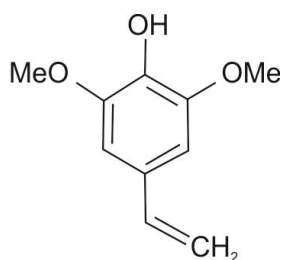


Figura A2. Estructura del 4-Vinilsiringol (Canolol).

A1.3.1. Propiedades bioactivas

Koski y col. (2003) estudiaron la actividad antioxidante del canolol e informaron que su actividad protectora de lípidos es similar a la del α -tocoferol. Kuwahara y col. (2004) encontraron que el canolol previene la rotura de la cadena de ADN inducida por el radical $\text{ONOO}\bullet$, mientras que Wakamatsu y col. (2005) propusieron que el canolol es más eficiente como secuestrante de radicales de alquil peroxilo que el α -tocoferol, la vitamina C, el β -caroteno, la rutina y la quercetina. Teniendo en cuenta que la reactividad de los radicales peroxilo es significativamente menor que la de otras especies reactivas de oxígeno (ROS), el canolol parece ser

un agente químico prometedor para prevenir y combatir el estrés oxidativo.

A1.3.2. Efecto anticancerígeno

El estrés oxidativo está relacionado con la carcinogénesis gástrica debido a su capacidad para dañar el ADN. Se ha asociado con el desarrollo de una gran cantidad de trastornos de la salud, como el cáncer, los trastornos cardiovasculares, la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer.

Cao y col. (2008) examinaron los efectos antioxidantes y antiinflamatorios del canolol sobre la gastritis inducida por *Helicobacter pylori* y la carcinogénesis gástrica en jerbos mongoles. Los resultados indicaron los efectos beneficiosos de canolol. Los niveles de *Helicobacter pylori* fueron significativamente menores en los grupos tratados con canolol. Además, la incidencia de adenocarcinoma gástrico se redujo en el grupo tratado con canolol en comparación con el grupo control. A su vez, Jiang y col. (2013) al evaluar el tratamiento de células cancerígenas gástricas con canolol, encontrando una apoptosis de las mismas por efecto del compuesto y por su parte Maeda y col. (U.S. Patent N°. 20090163600, 2009) desarrollaron un agente antiinflamatorio o agente preventivo del cáncer que comprende canolol. Según la afirmación de los autores, este agente antiinflamatorio es adecuado para el tratamiento de una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en gastro-duodenitis, úlcera gastroduodenal, gastritis, bronquitis, reumatismo, hepatitis,

colitis, conjuntivitis, neumonitis, pancreatitis, estomatitis, faringitis y quemaduras.

Teniendo en cuenta estos estudios, el contenido de canolol del aceite de canola crudo (220-1200 ppm) podría proporcionar dosis similares a las utilizadas en un estudio de Cao y col. (2008). Cabe señalar, sin embargo, que la concentración en el aceite de canola refinado es significativamente menor (Wakamatsu y col., 2005). La suplementación de aceite de canola con canolol extraído o sintetizado sería un método eficaz para enriquecer y agregar valor a los aceites.

A1.3.3. Actividad antioxidante

En la bibliografía, el canolol se describe como un antioxidante eficaz (Koski y col., 2003; Kuwahara y col., 2004; Vuorela y col., 2005; Wakamatsu y col., 2005). Matthaüs (2012) estudio la estabilidad oxidativa de aceites de colza conteniendo canolol, como se muestra en la **Figura A3** donde puede verse una mayor estabilidad oxidativa del aceite de canola acompañada de cantidades crecientes de canolol. Usando la prueba de Rancimat a 120 ° C, el contenido de canolol por debajo de 200 ppm en aceite de canola de granos tostados produjo una ligera disminución de la estabilidad oxidativa. Por el contrario, las cantidades de canolol superiores a 200 ppm mejoraron la estabilidad oxidativa del aceite. Wijesundera y col. (2008) también mostraron una mejora en la estabilidad oxidativa del aceite de canola virgen al tostar la materia prima antes de la extracción de aceite (165 ° C, 5 min). El proceso de tostado no

modificó ni la composición de ácidos grasos ni el contenido ni la composición de los tocoferoles. Los autores atribuyeron este efecto a la presencia de canolol formado durante la cocción. Al aumentar el contenido de canolol en el aceite de los granos cocidos, la estabilidad oxidativa mejoró.

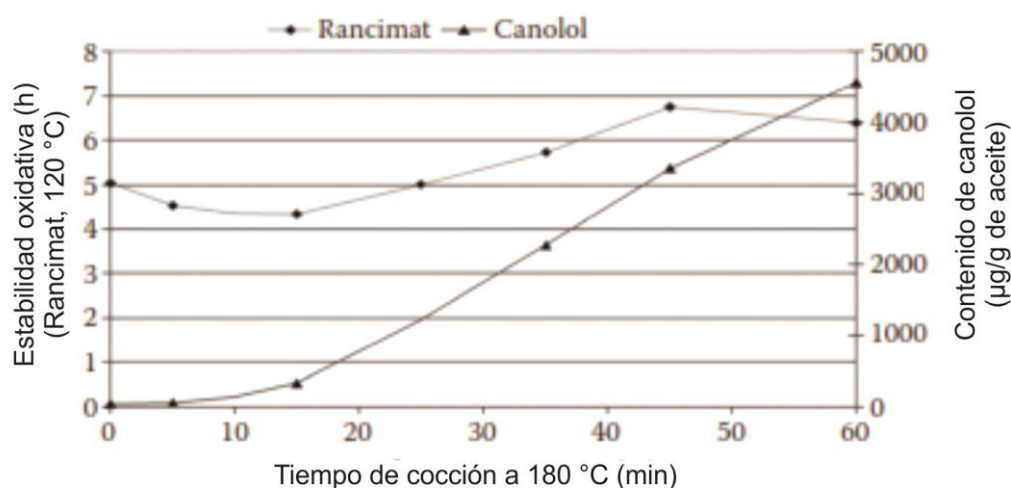


Figura A3. Formación del canolol durante la cocción de granos de canola y su efecto en la estabilidad oxidativa de los aceites resultantes en un test de Rancimat a 120 °C. (Matthaüs, 2012)

A1.3.4. Formación del canolol

El canolol no se ha detectado sólo en forma de trazas en el grano natural de colza, canola y otras plantas de *Brassica* (Thiyam-Holländer y col., 2012). Cortese y col. (2017) reportaron un contenido de 11 ppm en aceite de canola prensado en frío. Sin embargo, el contenido de canolol en canola y colza puede aumentar debido a altas temperaturas que pueden surgir durante el prensado en caliente (Koski y col., 2003) o la cocción de granos (Wakamatsu y col., 2005). El mecanismo para la formación de

canolol es la descarboxilación del ácido sinápico (Matthaüs, 2012) durante el calentamiento de las semillas de canola.

Thiyam-Holländer y col. (2012) informaron el efecto del calentamiento en un horno convencional (120-200 ° C) y el calentamiento por microondas (ya sea con vapor o sin vapor), encontrando que después de los tratamientos, el contenido de derivados de ácido sinápico así como fenólicos totales se vieron afectados. Los autores también discutieron que la generación de canolol, como resultado de la descarboxilación del ácido sinápico, varió con el nivel de temperatura y el período de tiempo. Durante este estudio, se descubrió que la sinapoil glucosa y sinapina disminuían significativamente con el transcurso del tiempo de tratamiento, mientras que aumentaba el contenido de ácido sinápico, trabajando a temperaturas menores o iguales a 160 °C. Sin embargo, el ácido sinápico a temperaturas superiores a 180 °C comenzaba a degradarse cuando se incrementaba el tiempo de tratamiento, aumentando el contenido de canolol.

En este contexto, Matthaüs (2012) analizaron el calentamiento de granos de canola en un horno de microondas a 650 W, dando como resultado la formación de canolol con degradación simultánea del ácido sinápico (**Figura A4**). Durante la formación de canolol, el contenido de ácido sinápico disminuyó de aproximadamente 30 mg/100 g de granos de canola a aproximadamente 7 mg/100 g después de 200 s de calentamiento.

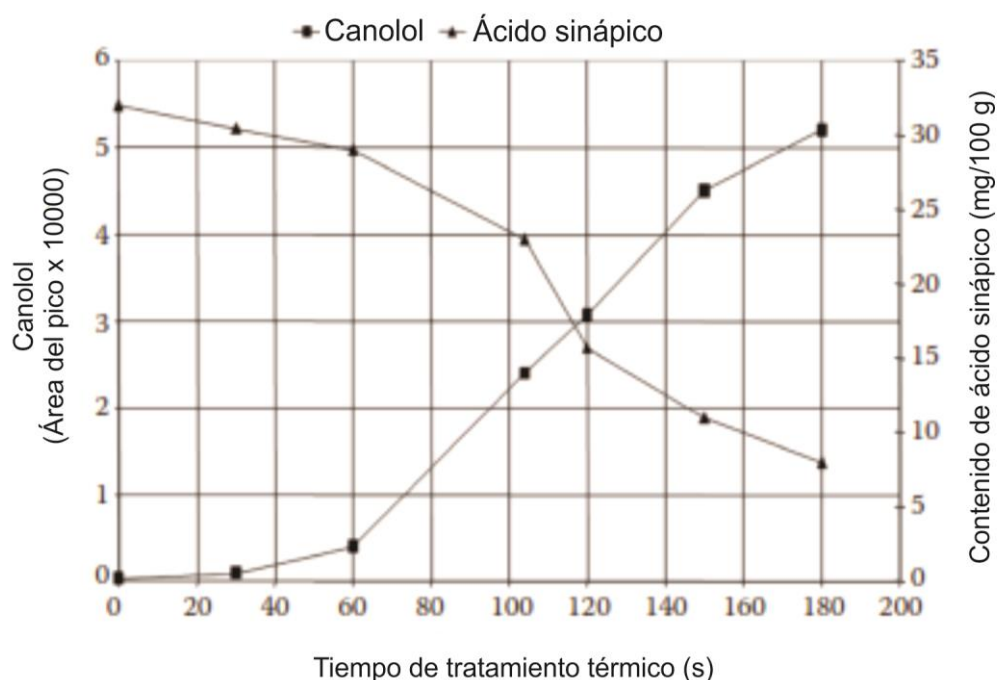


Figura A4. Influencia del calentamiento durante el tostado de granos de canola (Microondas) sobre la degradación de ácido sinápico y formación de canolol (Matthaüs, 2012).

Se especula que los altos rendimientos de canolol podría estar asociados con los diversos fenólicos presentes en la matriz de granos durante el tostado. Spielmeier y col. (2009) sometieron a calentamiento ácido sinápico aislado en un microondas y horno convencional, no registrando producción de canolol por decarboxilación del ácido. La disminución en los fenoles totales y derivados del ácido Sinápico (SAD) se continúan estudiando ya que los mecanismos subyacentes a la disminución dependiente de la temperatura en los fenoles totales y SAD aun deben ser dilucidados.

Como contrapartida, se ha detectado una baja vida útil del canolol en aceites de canola aún almacenado en condiciones de refrigeración y ausencia de oxígeno (Siger y Michalak, 2016). Rekas y col. (2018)

estudiaron la cinética de degradación del canolol en aceites almacenados, encontrando una dependencia de la velocidad con el contenido inicial del compuesto.

Por otro lado, más del 90% del canolol podría eliminarse durante la etapa de refinación del crudo (Kraljic y col., 2015). Harbaum-Piayda y col. (2010) demostraron la posibilidad de nuevos compuestos como diastereómeros cis y trans del dímero 4-vinilsiringol [cis-4,6dimetoxi-5-hidroxi-1-metil-3- (30,50-dimetoxi-40-hidroxifenil) indano y trans-4,6-dimetoxi-5-hidroxi-1-metil-3- (30,50-dimetoxi-40-hidroxifenil) indano] y el trímero de vinilsiringol en los aceites comerciales de colza, así como en un subproducto comercial de la refinación de aceite, el destilado del desodorizado. El dímero de canolol recientemente identificado estaba presente en el destilado del desodorizado del aceite de colza procesado en cantidades significativas (~ 3,50 g / kg).

A2. CAPÍTULO 3

A2.1. Programación en C++ del algoritmo de cálculo para determinar el número de términos influyentes en la solución modificada de Fick

```
include<iostream>

#include<cstdlib>

#include<math.h>

#include <stdio.h>

#include <stdlib.h>

#include <windows.h>

#include <conio.h>
```

```
using namespace std;

float B,i,R,t,A,H,P,n,M,G,U,k,resp,ter,x,to;

int main()

{

    float sum;

    cout<<" \n";

    cout<<"-----

-----";

    cout<<" \n";

    cout<<"BUENOS DIAS USUARIO \n";

        cout<<" \n";

        cout<<"ESTE ES UN PROGRAMA DISEÑADO PARA DETERMINAR

LA"<<"\n"<<"CANTIDAD DE TERMINOS INFLUYENTES EN LA SOLUCION

DE FICK"<<"\n";

        cout<<" \n";

        cout<<"EL PROGRAMA MOSTRARA EL RENDIMIENTO DE

EXTRACCION PARA MODELOS"<<"\n"<<"INCLUYENDO LOS DIFERENTES

TERMINOS Y CONCLUIRA CUANDO DETECTE"<<"\n"<<"UNA DIFERENCIA

MENOR A 0.1 AL ADICIONAR MAS TERMINOS"<<"\n";

        cout<<" \n";

        cout<<"SE REQUIERE LOS VALORES DE LOS PARAMETROS

OBTENIDOS CON UN MODELO INICIAL \n";

        cout<<" \n";
```

```
cout<<"SI EL ULTIMO NUMERO DE TERMINOS COINCIDE CON EL
NUMERO DE TERMINOS UTILIZADO,"<<"\n"; cout<<"LA ITERACION
CONCLUYE \n";

cout<<" \n";

cout<<"AUTOR: ING. RAMIRO SANCHEZ \n";

cout<<" \n";

cout<<"SEA: \n";    cout<<" \n";

cout<<"Mo/Minf = FRACCION DE LAVADO (RANGO 0-1)"<<"\n";

cout<<" \n";

cout<<"B = DEFF.PI^2/R^2 (UNIDAD:1/tiempo)"<<"\n";

cout<<" \n";

cout<<"to      =      TIEMPO      DE      LAVADO      PROPUESTO
(UNIDAD:tiempo)"<<"\n";

cout<<" \n";

cout<<"t      =      MENOR      TIEMPO      DE      EXTRACCION      MEDIDO
(UNIDAD:tiempo)"<<"\n"<<" "<<"\n"<<"INTRODUZCA Mo/Minf=";

cin>>A;

cout<<"INTRODUZCA B=";

cin>>B;

cout<<"INTRODUZCA to=";

cin>>to;

cout<<"INTRODUZCA t=";

cin>>t;

{

for (i=1; i < 600000; i++)
```

```
{
do
{
R=((1-A)*6/(M_PI*M_PI))*(1/(exp((t-to)*B*i*i)*i*i));

sum+=R;

H=1-sum;

}

while(R<0.001);

{
P=100*(((1-((1-A)*6/(M_PI*M_PI))*(1/(exp((t-to)*B)))))-
H)/((1-((1-A)*6/(M_PI*M_PI))*(1/(exp((t-to)*B))))));

cout<<" \n";

cout<<"Rendimiento = "<<H<<" \n";

cout<<"Error relativo en comparacion con el modelo de 1
termino = "<<P<<"% \n";

cout<<"La cantidad de terminos necesarios es "<<i<<". \n";

}

}

}

}
```


A2.2. Captura de pantalla del programa diseñado aplicado al sistema correspondiente a la muestra sin pretratamiento a 298 K del Capítulo 3



```
serie 3.0

-----
BUENOS DIAS USUARIO
ESTE ES UN PROGRAMA DISEÑADO PARA DETERMINAR LA
CANTIDAD DE TERMINOS INFLUYENTES EN LA SOLUCION DE FICK
EL PROGRAMA MOSTRARA EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION PARA MODELOS
INCLUYENDO LOS DIFERENTES TERMINOS Y CONCLUIRA CUANDO DETECTE
UNA DIFERENCIA MENOR A 0.01 AL ADICIONAR MAS TERMINOS
SE REQUIERE LOS VALORES DE LOS PARAMETROS OBTENIDOS CON UN MODELO INICIAL
SI EL ULTIMO NUMERO DE TERMINOS COINCIDE CON EL NUMERO DE TERMINOS UTILIZADO,
LA ITERACION CONCLUYE
AUTOR: ING. RAMIRO SANCHEZ
SEA:
Mo/Minf = FRACCION DE LAVADO (RANGO 0-1)
B = DEFF.PI^2/R^2 (UNIDAD:1/tiempo)
to = TIEMPO DE LAVADO PROPUESTO (UNIDAD:tiempo)
t = MENOR TIEMPO DE EXTRACCION MEDIDO (UNIDAD:tiempo)
INTRODUZCA Mo/Minf=-0.03
INTRODUZCA B=0.000063
INTRODUZCA to=0
INTRODUZCA t=300

Rendimiento = 0.385558;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = -4.83144e-006%;
La cantidad de terminos necesarios es 1.

Rendimiento = 0.240416;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 37.6449%;
La cantidad de terminos necesarios es 2.

Rendimiento = 0.181724;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 52.8672%;
La cantidad de terminos necesarios es 3.

Rendimiento = 0.152802;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 60.3687%;
La cantidad de terminos necesarios es 4.

Rendimiento = 0.137187;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 64.4187%;
La cantidad de terminos necesarios es 5.

Rendimiento = 0.128378;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 66.7033%;
La cantidad de terminos necesarios es 6.

Rendimiento = 0.123317;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 68.0161%;
La cantidad de terminos necesarios es 7.

Rendimiento = 0.120398;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 68.7731%;
La cantidad de terminos necesarios es 8.

Rendimiento = 0.118726;
Error relativo en comparacion con el modelo de 1 termino = 69.2068%;
La cantidad de terminos necesarios es 9.

-
```

A2.3. Programación en SigPlot 12.0 del modelo bidimensional de difusión de Fick modificada.

```

f=1-a*0,6079*((exp(-b*exp(-(c/y))*x))+(0,25*exp(-b*exp(-(c/y))*4*x))+(0,111111*exp(-b*exp(-(c/y))*9*x))+(0,0625*exp(-b*exp(-(c/y))*16*x))+(0,04*exp(-b*exp(-(c/y))*25*x))+(0,028*exp(-b*exp(-(c/y))*36*x))+(0,02*exp(-b*exp(-(c/y))*49*x))+(0,0156*exp(-b*exp(-(c/y))*64*x))+(0,0123*exp(-b*exp(-(c/y))*81*x)))

fit f to z

'fit f to z with weight reciprocal_z
'fit f to z with weight reciprocal_zsquare
'fit f to z with weight reciprocal_pred
'fit f to z with weight reciprocal_predsqr

y = col(1) ' {{prevmin: 298,000000}} {{prevmax: 333,000000}}
{{intervals: 15}}

x   =   col(2)   '   {{prevmin:   300,000000}}   {{prevmax:
64800,000000}} {{intervals: 15}}

z = col(3) ' {{prevmin: 0,000000}} {{prevmax: 64800,000000}}
{{intervals: 15}}

'Automatic Initial Parameter Estimates

yhat(q) = q[size(q)]

F(q)      =      if(size(x)>1.      if(total(abs(z))>0.
ape(x.log(abs(z)).1.0.1). -306). 0)

```

```

assign(q) = if(mean(q)>=0.1.-1)
a = max(y)-yhat(y)  ''Auto {{previous: 0,756296}}
b = if(F(0)[1]< 307. if(F(0)[1]>-307. assign(z)*10^F(0)[1].
assign(z)*10^(-307)). assign(z)*10^307)  ''Auto {{previous:
0,242654}} {{MinRange: -3}} {{MaxRange: 9}}
c = if(x50(y.z)-min(y)=0. 1. -ln(,5)/(x50(z.y)-min(y)))
''Auto {{previous: 2570,73}} {{MinRange: 0}} {{MaxRange: 1}}

a<1
a>0

```

A3. CAPÍTULO 5

A3.1. Calibración de la punta ultrasónica

A3.1.1. Cálculo de la potencia ultrasónica

La entrada de energía del ultrasonido en el fluido se calculó utilizando el método calorimétrico descrito por Narváez-Flores y col. (2015) y Moreno-Castro y col. (2015) y se comparó con los correspondientes valores leídos directamente en el equipo. La potencia ultrasónica absorbida (P, Watts) se determinó según la siguiente ecuación:

$$P = m.Cp_m \cdot \frac{dT}{dt} \quad (A.1)$$

Donde:

P es la potencia ultrasónica (W).

m es la masa total expuesta a la energía ultrasónica (kg).

Cp_m es el calor específico medio, tomado como un promedio ponderado de los calores específicos correspondientes a la muestra, al material del recipiente (vidrio) y al medio fluido (solvente), como se muestra en la Tabla A-1. (kJ/kg K).

Tabla A-1. Valores de Capacidad calorífica (Cp) y Masa (m) de los materiales para el cálculo de la potencia ultrasónica.

Material	Capacidad calorífica (Cp)	Masa (m)
Vidrio	837 J/kgK*	0,19167 kg
Etanol	2460 J/kgK*	0,19178 kg
Canola	1,93 J/kgK**	0,00893 kg

* Datos extraídos de Perry y col. (1997).

** Calculados a partir de la composición proximal del grano (Ibarz y Barbosa-Cánovas; 2005).

dT/dt es el cambio de temperatura registrado en un intervalo de tiempo. La temperatura del medio se midió con la Termocupla del equipo VCS-500 equipment (Accesorio del Punta Sonicadora). Las mediciones se realizaron por cuatuplicado.

En la **Tabla A-2** se muestran las potencias absorbidas (potencia calculada según ecuación A.1 y la potencia leída o reportada por el equipo) correspondientes a una amplitud de 35%.

Tabla A-2. Potencia absorbida (P) por la muestra (leída y calculada) para una amplitud de 35%.

Amplitud	Temperatura (K)	Potencia calculada (W)	Potencia leída (W)
35%	306	-	21
	310	21,1	21
	314	21,1	21
	318	21,1	21

Los ensayos de calibración muestran una elevada correspondencia entre las potencias leídas.

Bibliografía

- Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F. (2000). Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2755-2759.
- Cao, X., Tsukamoto, T., Seki, T., Tanaka, H., Morimura, S., Cao, L., ... Tatematsu, M. (2008). 4-Vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in

- Helicobacter pylori-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *International Journal of Cancer*, 122(7), 1445-1454.
- Cortese, C.M., Portela, G., Sanchez, R.J. (2017). Exploring the effect of combined hydrothermal-microwave pretreatment operating conditions on canola oil expression. *Journal of Food Technology and Preservation*, 1(3), 1-6.
- Harbaum-Piayda B., Oehlke K., Sönnichsen F.D., Zacchi P., Eggers R., Schwarz K. (2010). New polyphenolic compounds in commercial deodistillate and rapeseed oils. *Food Chemistry*, 123(3), 607–615.
- Ibarz A., Barbosa-Cánovas G.V. (2005). *Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos*. México DF, México: Mundi-Prensa Ediciones.
- Jiang, J., Cao, D.H., Tsukamoto, T., Wang, G.Q., Jia, Z.F., Suo, J., Cao, X.Y. (2013). Anticancer effects of 4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncology Letters*, 5(5), 1562-1566.
- Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wähälä, K., Heinonen, M. (2003). Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food Research and Technology*, 217(2), 110-114.

- Kraljić K., Škevin D., Barišić L., Kovačević M., Obranović M., Jurčević I. (2015) Changes in 4-vinylsyringol and other phenolics during rapeseed oil refining. *Food Chemistry*. 187, 236-242.
- Kozłowska, H., Zadernowski, R., Sosulski, F.W. (1983). Phenolic acids in oilseed flours. *Molecular Nutrition & Food Research*, 27(5), 449-453.
- Kozłowska, H., Naczek, M., Shahidi, F., Zadernowski, R. (1990). Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. En Shahidi, F. (Ed.) *Canola and Rapeseed* (pp. 193-210). New York, USA:Springer.
- Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T., Maeda, H. (2004). Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (canolol) isolated from canola oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4380-4387.
- Maeda H., Tsukamoto T., Tatematsu M. (2009). *U.S. Patent N° 20090163600*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Matthäus, B. (2012). Chapter 17 Effect of Canolol on Oxidation of Edible Oils. En Thiyam-Holländer, U., Eskin, N. M., Matthäus, B. (Eds.) *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*. (pp. 291-306). New York, USA: CRC Press.
- Moreno-Castro, L.E., Quintero-Ramos, A., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Sánchez-Madrigal, M.A.C.O., Meléndez-Pizarro, C.O., Pérez-Reyes I., Lardizábal-Gutiérrez, D.D. (2015). Nixtamalization assisted with

- ultrasound: effect on mass transfer and physicochemical properties of nixtamal, masa and tortilla. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 265-279.
- Naczki, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F. (1998). Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chemistry*, 62(4), 489-502.
- Narváez-Flores, M., Sánchez-Madrigal, M.A., Quintero-Ramos, A., Paredes-Lizárraga, M.A., González-Laredo, R.F., Ruiz-Gutiérrez, M.G., Piñón-Castillo, H.A., Meléndez-Pizarro, C.O. (2015). Ultrasound assisted extraction modeling of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) at different temperatures and ultrasound powers. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 232-239.
- Perry, R.H.G., Maloney, D.W., James, O., (1997). *Manual del ingeniero químico. 7ma edición*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Rękas, A., Siger, A., Wroniak, M., Ścibisz, I. (2018). Phytochemicals and Antioxidant Activity Degradation Kinetics During Long-Term Storage of Rapeseed Oil Pressed From Microwave-Treated Seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(2), 1700283.
- Shahidi, F., Naczki, M. (1992). An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(9), 917-924.

- Siger, A., Michalak, M. (2016). The long-term storage of cold-pressed oil from roasted rapeseed: Effects on antioxidant activity and levels of canolol and tocopherols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(7), 1030-1041.
- Spielmeyer, A., Wagner, A., Jahreis, G. (2009). Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food chemistry*, 112(4), 944-948.
- Thiyam-Holländer, U.; Meda, N.; Nag, K.; Nag, A. (2012) Chapter 3 Valuable Vinylphenols from Rapeseed and Canola Decarboxylative Pathways. En Thiyam-Holländer, U., Eskin, N. M., Matthäus, B. (Eds.) *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*. (pp. 317-328). New York, USA: CRC Press.
- Vuorela, S., Meyer, A.S., Heinonen, M. (2003). Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. *European Food Research and Technology*, 217(6), 517-523.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hämäläinen, M., Galkin, A., ... Vuorela, H. (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5922-5931.

- Wakamatsu, D., Morimura, S., Sawa, T., Kida, K., Nakai, C., Maeda, H. (2005). Isolation, identification, and structure of a potent alkylperoxyl radical scavenger in crude canola oil, canolol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(8), 1568-1574.
- Wijesundera, C., Ceccato, C., Fagan, P., Shen Z. (2008). Seed roasting improves the oxidative stability of canola (*B.napus*) and mustard (*B. juncea*) seed oils. *European Food Research and Technology*. 110(4), 360–367.